

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANE KÖKENLİ *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* VE *ACINETOBACTER
BAUMANNII* SUŞLARINDA
KARBAPENEM DİRENCİNE NEDEN
OLAN BETA LAKTAMAZLARIN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Biyolog Şafak ANDIÇ

2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

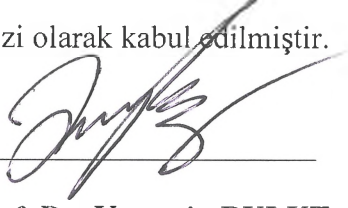
Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora

Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Yasemin BULUT

Danışman



Doktora Tez Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yasemin BULUT 

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN 

Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN 

Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU 

Prof. Dr. Turgut KARLIDAĞ 

TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, mesleğinin inceliklerini sabır ve titizlikle öğreten ve tez çalışmam süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yasemin BULUT'a, doktora eğitimim süresince yetiŐmemde emeği olan, bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan hocalarım; Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a, Prof. Dr. Zölal AŐCI TORAMAN'a, Prof. Dr. Adnan SEYREK'e ve Ahmet KIZIRGİL'e, Fırat Üniversitesi Tıp Faköltesi moleköler mikrobiyoloji bölümünde çalışan değerli personel ve asistan arkadaşlarıma, tezimin gerçekleşmesi için tıbbi malzeme alımını sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığına, Bölümde yüksek lisans yapan değerli arkadaşım Oğuzhan HANCI'ya çok içten teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER.....	VII
RESİMLER.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Hastane enfeksiyon etkenleri.....	6
3.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
3.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	18
3.2. Antibakteriyellerin etki mekanizmaları.....	24
3.3. Beta laktam antibiyotikler.....	25
3.3.1. Penisilinler.....	26
3.3.2. Sefalosporinler.....	29
3.3.3. Monobaktamlar.....	31
3.3.4. Karbapenemler.....	31
3.3.5. Beta laktamaz inhibitör kombinasyonları.....	33
3.4. Antibakteriyellerin direnç mekanizmaları.....	34
3.5. Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları.....	38
3.5.1. PBP'lerde oluşan değişiklikler sonucu oluşan direnç.....	38
3.5.2. İlacın hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç.....	39
3.5.3. Beta laktamaz enzimlerinin oluşturduğu direnç.....	41

3.6. Beta laktamazların sınıflandırılması	44
3.7. Karbapenemlere direnç mekanizmaları	51
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
4.1. Çalışmada kullanılan bakteri örneklerinin toplanması	55
4.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve EDTA hazırlanışı	55
4.3. Bakterilerin tiplendirilmesi.....	56
4.4. Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri	56
4.5. Karbapenemazların fenotipik yöntemlerle identifikasyonu	57
4.5.1. Kombine disk sinerji testi	57
4.5.2. Çift disk sinerji testi.....	58
4.5.3. Modifiye Hodge testi	58
4.6. Direnç genlerinin araştırılması	59
4.6.1 DNA ekstraksiyonu	59
4.6.2. PCR için kullanılan çözeltiler ve tamponlar:.....	59
4.6.3. PCR ile hedef gen bölgelerinin çoğaltılması	60
4.6.4. Amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi	65
4.7. Sekanslama	66
4.8. İstatistik analiz.....	67
5. BULGULAR	68
6. TARTIŞMA.....	85
7. KAYNAKLAR.....	95
8. ÖZGEÇMİŞ.....	107

TABLÖLAR

Tablo 1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri.....	13
Tablo 2. Doripenem, ertapenem, imipenem ve meropenemin <i>Enterobacteriaceae</i> ve non fermentatif gram negatif bakteriler için MİK değerleri.....	33
Tablo 3. Bush-Jacoby ve Ambler'e göre beta laktamazların sınıflandırılması.....	43
Tablo 4. Çalışmada kullanılan primerler.....	60
Tablo 5. Klinik izolatların hastane ünitelerine göre dağılımı.....	68
Tablo 6. <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> suşlarının gelen klinik materyallere göre dağılımı.....	69
Tablo 7. <i>A. baumannii</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları.....	70
Tablo 8. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları.....	71
Tablo 9. <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> suşlarında fenotipik test sonuçları.....	72
Tablo 10. <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında PCR sonuçları.....	75

ŞEKİLLER

Şekil 1. Beta laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2. OXA-23 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe ait dizilimin gen bankasında mevcut <i>A. baumannii</i> genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları.....	79
Şekil 3. OXA-51 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe ait dizilimin gen bankasında mevcut <i>A. baumannii</i> genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları.....	80
Şekil 4. OXA-58 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe ait dizilimin gen bankasında mevcut <i>A. baumannii</i> genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları.....	81
Şekil 5. OXA-23 primerleri ile çoğaltılan 9 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu.....	82
Şekil 6. OXA-51 primerleri ile çoğaltılan 1 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu.....	83
Şekil 7. OXA-58 primerleri ile çoğaltılan 14 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu.....	84

RESİMLER

Resim 1. Negatif çift disk sinerji testi ve negatif kombine disk testi.....	72
Resim 2. Pozitif çift disk sinerji testi ve pozitif kombine disk testi.....	73
Resim 3. Negatif modifiye hodge testi	73
Resim 4. Pozitif modifiye hodge testi.....	74
Resim 5. KPC tipi karbapenemazların jel görüntüsü (785 bp)	76
Resim 6. OXA-23 tipi karbapenemazların jel görüntüsü (501 bp).....	76
Resim 7. OXA-51 tipi karbapenemazların jel görüntüsü (353 bp).....	77
Resim 8. OXA-58 tipi karbapenemazların jel görüntüsü (691 bp).....	77

KISALTMALAR

g	: Gram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
AATC	: <i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	: <i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ETDA	: Etilen diamin tetra asetik asit
GSBL	: Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz
MBL	: Metallo beta laktamaz
PBP	: Penisilin bağlayan protein
Omp	: ' <i>outer membrane protein</i> ' dış membran proteini
Kb	: Kilo baz çifti
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EMB	: Eozin Metilen Blue
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
TBE	: Tris-Borik asit EDTA
ÇDT	: Çift disk sinerji testi
KBT	: Kombine disk sinerji testi
MHT	: Modifiye Hodge testi

1. ÖZET

Çoklu direnç gösteren enfeksiyonların tedavisinde, iyi bir seçenek oluşturan karbapenemlere dirence neden olan karbapenemazların önemi, son yıllarda giderek artmıştır. Çalışmamızda, Fırat Üniversitesi Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında karbapenem direnç genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, Mart 2011-Mart 2012 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen, 50 *P. aeruginosa*, 50 *A. baumannii* suşu, klasik yöntemler ve BD Phoneix bakteri identifikasyon cihazı kullanılarak identifiye edilmiştir. İmipenem dirençli suşlarda, kombine disk, çift disk sinerji, modifiye Hodge fenotipik testleri yapılarak, karbapenemaz enzimi araştırılmıştır. İmipenem dirençli suşlarda, *bla_{OXA}* grubu, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* direnç genleri, PZR yöntemiyle çalışılmıştır. PZR sonuçlarına göre *A. baumannii* suşlarında karbapenem direnç genlerinden *bla_{OXA-51}* %98, *bla_{OXA-58}* %14, *bla_{OXA-23}* %14 ve *bla_{KPC}* %8 oranında pozitif bulunmuştur. Çalışmaya alınan suşlarda OXA-24, VIM ve IMP enzimleri için kodlayan genler bulunmamıştır. *P. aeruginosa*'da ise çalışılan genlerin varlığı tespit edilememiştir. Gen pozitif suşlardan elde edilen amplikonların sekans analizi yapılmış ve gen bankasındaki sekanslarla karşılaştırılmıştır. Sekanslar arasında filogenetik ilişki araştırılmış ve dizilim farklılıkları 0.75'e göre hesaplanmıştır. Elde edilen dizilimlerin gen bankasındaki dizilimler ile BLAST programında belirlenen benzerliği 5 OXA-23 sekansı için %97-99, 8 OXA-51 sekansı için %95-98 ve 7 OXA-58 sekansı için ise %99-100 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Bu alışma bölgemizde yapılan ilk çalışma olması ve karbapenamaz genlerinin yaygın olarak saptanması açısından önem taşımaktadır. Direnç genlerinin ve mekanizmalarının bilinmesi hem hastaların tedavilerinin yönlendirilmesi hem de epidemiyolojik verilerin oluşturulmasından dolayı önemlidir.

Anahtar kelimeler: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, OXA-51, OXA-58, OXA-23, OXA-24, VIM, IMP.

2. ABSTRACT

Phenotypic and genotypic determination of beta lactamases causing carbapenem resistance in hospital acquired *pseudomonas aeruginosa* and *acinetobacter baumannii*

Carbapenems are important antibiotics for the treatment of infections due to multiple resistant Gram-negative bacteria and the dissemination of carbapenemases became more important last years. In the present study presence of carbapenem resistance genes among *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolated from inpatients of Fırat University hospital was studied.

A total of 50 *P. aeruginosa*, and 50 *A. baumannii* isolated from various clinical samples from March 2011 to March 2012 included to the study. Identification of bacteria at specie level was done using classical method and confirmed with BD Phoneix bacteria identification system. Imipenem susceptibility was tested by disk diffusion test and presence of carbapenemases was tested by combined disk, double disk synergy test and modified Hodge test. All imipenem resistance isolates were tested for the presence of *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} by PCR. The results showed that *bla*_{OXA-51} were positive in 98% of *A. baumannii*, *bla*_{OXA-58} 14%, *bla*_{OXA-23} 14% and *bla*_{KPC} 8%. All of the *A. baumannii* were negative for the genes encoding for OXA-24, VIM and IMP enzymes. All *P. aeruginosa* isolates were negative for the genes studied. The sequence analysis of the amplicons were done and compared with the sequences in genebank. Phylogenic analysis of the sequences and the differences were calculated by 0.75. The homology of the amplicons and genebank sequences were determined using BLAST program. Homology of 5

OXA-23 amplicons were 97-99%, 8 OXA-51 were 95-98%, 7 OXA-58 were 99-100%.

This is the first carbapenemase gene detection study in our region and presence of carbapenemase genes found to be common. Studies on dissemination resistance genes and resistance mechanisms are important to have epidemiologic data and to guide treatment of patients infected with resistant bacteria.

Keywords: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, OXA-51, OXA-58, OXA-23, OXA-24, VIM, IMP.

3. GİRİŞ

P. aeruginosa ve *A. baumannii* klinik olarak hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen nonfermentatif gram negatif bakterilerdendir (1). Bu iki etken yatan hastalardan özellikle yoğun bakım hastaları, yanık, AIDS, prematüre bebeklerde ve kistik fibrozlu hastaların solunum yollarında enfeksiyonlara neden olan önemli fırsatçı patojenlerdendir (2, 3).

P. aeruginosa ve *A. baumannii* antibiyotiklere kolay direnç geliştirmekte ve farklı direnç mekanizmalarını aynı suşlarda bulundurabilmektedirler. Bundan dolayı bu bakterilerin klinik önemleri artmaktadır (4, 5). Bu mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde en etkili antibiyotikler beta laktam grubuna ait antibiyotik olan karbapenemlerdir. Karbapenemlerin klinik kullanımda olanları imipenem, meropenem, doripenemdir (1, 6). Karbapenemleri diğer beta laktam antibiyotiklerden ayıran kimyasal farklılık, beta laktam halkasındaki tiyazolidinik ekinde sülfon yerine karbon içermeleridir. Karbapenemlere direnç hem plazmid hem de kromozomal kökenli beta laktamazlarla gelişebilir (1, 7). Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinde en önemli mekanizma bakterilerin ürettiği beta laktamaz enzimleridir. Son yıllarda genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ve plazmidler ile taşınan Amp C beta laktamazlar bulunmuş ve sayıları artmıştır. Karbapenemler GSBL ve Amp C beta laktamaz enzimleriyle inaktive olmadıkları için ciddi enfeksiyonların tedavisinde en iyi seçenek olmuşlardır (8, 9, 10). Ancak son yıllarda karbapenem grubu antibiyotikleri inaktive eden beta laktamaz enzimleri olan karbapenemazlar önem kazanmıştır. Karbapenemazlar hareketli hidrolitik yeteneğe sahiptirler ve penisilin, sefalosporin, monobaktam ve

karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize etme yetenekleri olduğundan, karbapenemazları üreten bakteri enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri azalır. Karbapenemazlar; A, B ve D moleküler sınıf beta laktamazların üyeleridir. A ve D sınıfı enzimleri serin temelli hidrolitik mekanizmasına sahipken, B sınıfı enzimleri aktif kısımlarında çinko bulunduran metallo beta laktamazlardır. Bunlardan en yaygın olarak saptananlar A sınıfında bulunan KPC enzimi, B sınıfında bulunan ve klinik olarak en önemli olan metallo beta laktamaz enzimlerinden IMP, VIM, NDM grubu enzimler ve D sınıfında bulunan OXA grubu enzimlerdir (6, 9, 10, 11).

P. aeruginosa ve *A. baumannii* suşunda bulunan çok sayıdaki farklı direnç mekanizmalarından dolayı duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesinde birçok zorluklarla karşılaşmaktadır (12). Direnç mekanizmalarının bilinmesi hem hastaların tedavilerinin yönlendirilmesi hemde epidemiyolojik verilerin oluşturulmasında önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastalardan laboratuvarımıza gönderilen çeşitli materyallerden izole edilen yaklaşık 50 *P. aeruginosa*, 50 *A. baumannii* suşunda karbapenem direncine neden olan beta laktamların fenotipik ve genotipik olarak belirlemek ve sonuçların epidemiyolojik olarak değerlendirerek, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarındaki karbapenemazların hastanemizdeki gerçek prevalansını saptamak, karbapenemaz genlerinin yayılmasını önlemek ve tedavide uygun antibiyotiklerin kullanılmasını sağlamaktır.

3.1. Hastane enfeksiyon etkenleri

Günümüzde tıp alanındaki gelişmelere rağmen hastane enfeksiyonları çok

önemli bir sorundur. Hastane enfeksiyonu hastaneye yatıştan yaklaşık 72 saat sonra ve taburcu olduktan sonraki bir aylık dönemde ortaya çıkan enfeksiyonlardır (13).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, hastane enfeksiyonlarının; hastaneye yatan hastaların %3.1-%14.1'inde geliştiği tespit edilmiştir. Ayrıca ülkemizdeki bazı hastanelerden alınan verilere göre hastane enfeksiyonlarının oranı yaklaşık %3-7.8 arasındadır (13). Bu oranlar hastaneden hastaneye ve aynı hastanenin farklı servislerine göre değişiklik gösterebilir. Gelişmekte olan ülkelerde sosyoekonomik faktörler ve bilinçsiz antibiyotik kullanımından dolayı bu oranlar daha yüksek olabilir. Bu nedenle hastane enfeksiyonları antimikrobiyal direncin artmasına ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (12, 14).

Hastane enfeksiyonlarında izole edilen mikroorganizmalar; uygunsuz ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile invazif girişimlerin artması sonucu zaman içinde değişiklik göstermiştir. Günümüzde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, koagulaz negatif stafilokoklar, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* türleri, enterokoklar ve *Candida* türlerinde anlamlı artış görülmektedir (15).

3.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ilk kez Gessard tarafından 1882 yılında mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır (5). 19. yüzyılın sonlarına doğru insanda neredeyse tüm anotomik bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş ve 1980'lerden sonra hastane enfeksiyon etkeni olarak görülmeye başlamıştır.

P. aeruginosa, *Pseudomonadaceae* ailesinin bir üyesi olup, *Pseudomonas* cinsinin en iyi tanımlanan türüdür. *Pseudomonas* cinsinde bulunan bakteriler

rRNA homolojilerine göre gruplara ayrılmış ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda yeniden sınıflandırılmıştır (2, 5).

1. Morfoloji ve boyanma özellikleri:

P. aeruginosa yaklaşık olarak 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, gram negatif çomaktır. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır. Uçlarda bir nadiren iki veya üç polar konumlu kirpiği vardır ve bu nedenle çok hareketlidir (2, 5).

2. Kültür özellikleri:

P. aeruginosa zorunlu aerob, nitratlı ortamlarda ve arjinin varlığında anaerob da üreyebilirler. Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturarak ürer ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigmenti ile ayırt edilebilir. Laboratuvar şartlarında triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukulata agar, Mueller Hinton agar (MHA), endo ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği ile diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılır, ancak 4°C'de üremez (2, 5).

P. aeruginosa katı besiyerinde yaklaşık 3-5 mm kadar, yuvarlak, yumuşak, yassı, metalik parlaklık veren koloniler şeklinde ürer. Kanlı agarda beta hemoliz yapar ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Bu görünüm piyosiyanın pigmentine bağlıdır. Mac Conkey agarda laktoz negatif, mavi-yeşil koloniler gelişir. İzolasyon için 24-48 saat yeterlidir. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen ve aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) oluşturan suşları ise mukoid tiptedir (2, 5).

3. Biyokimyasal özellikleri:

P. aeruginosa oksidaz pozitif ve glikozu fermente etmemesi yani nonfermentatif olmaları ile *Enterobacteriaceae*'den ayrılır. Oksidasyon yoluyla

glikoz ve ksilozu parçalarken, maltoza parçalamaz. Katalaz ve L-arginin dihidrolaz oluşturur; lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmaz (2). Ayrıca diğer bazı biyokimyasal özellikleride; metil kırmızısı ve Voges Proskauer negatiftir, üreyi parçalar, sitratı kullanabilir, nitrattın gaz oluşturur ve üç şekerli demirli (TSI) besiyerinde H₂S yapmaz.

Kültür ortamı ve organizmada hidrosiyamik asit yapma özelliğine sahiptir. *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* aynı bakterilerin diğer kökenlerine etki ederek onları eriten bakteriyosinler yaparlar. Bakteriyosin tiplendirmesi, *P. aeruginosa* kaynaklı hastane enfeksiyonu salgınlarında epidemiyolojik takip için kullanılan yöntemlerden biridir. *P. aeruginosa* piyoverdin (yeşil-sarı) ve piyosiyanın (mavi-yeşil) floresan pigmentleri yapar. Klinik izolatların çoğunda piyosiyanın olduğu için nötr veya alkali ortamda mavi-yeşil görülür, bu pigmentten dolayı *P. aeruginosa* tür adı verilmiştir. Ayrıca bu pigmentler uzun dalga boyu UV ışığında floresan verir (2, 5).

P. aeruginosa'nın kültürdeki aromatik meyve kokusu, 2-aminosetofenon kaynaklıdır ve bu özellik bakteri için karakteristiktir (13).

4. Antijenik yapı:

Epidemiyolojik çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarını gruplara ayırmak için lipopolisakkarit yapıdaki O antijenleri kullanılır. *P. aeruginosa*'nın, Fisher-Devlin Gnabasic sistemine göre 7, IATS ye göre ise 17 farkı tip O antijeni vardır. Uzun süre kaynatma veya otoklavlama sonucu elde edilen ölü bakteri süsüpsiyonu tavşana şırınga edilmesi sonucu tavşan kanında oluşan antiserumdan elde edilen O antijenleri hala aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır. *P. aeruginosa*'da H antijeni, pilus antijenleri ve başka ısıya duyarlı antijenlerde bulunmuştur (2).

5. Virulans ve patojenite özellikleri:

P. aeruginosa fırsatçı patojendir ve hastalık oluştururken pigmentler, hemolizinler, ekzotoksin A, ekzoenzim S, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adhezinleri ve aljinat gibi yapıları yardımcı olmaktadır. Bunlar, bakterinin konağa yerleşmesine ve konağa ait hücreleri hasara uğratmasına yardımcı olurlar (17).

P. aeruginosa kökenlerinin büyük çoğunluğu bir yada daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil-sarı renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, mavi-yeşil renkli piyosiyanın pigmentidir. Bu özellik *P. aeruginosa*'nın tanısı için önemlidir. Piyosiyanın akciğer epitel ve endotel hasarından kısmen sorumludur, nazal silyaların fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Ayrıca ürettiği oksijen radikalleri hücreye zarar verir ve katalaz aktivitesini inhibe eder. Her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamışsa da, diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları saptanmıştır. Piyosiyanın pigmenti bakteri hücrelerinin demir alımında da rol oynamaktadırlar (2, 5, 17).

P. aeruginosa iki çeşit hemolizin yapar, bunlardan biri glikolipid yapısında, ısıya dayanıklı olan ramnolipittir. Bu molekül deterjan benzeri bir etki göstermektedir. Ayrıca monositlerden oksijen radikalinin jenarasyonunu arttırarak *P. aeruginosa* ile enfekte kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde doku hasarına neden olmaktadır. (2, 16, 17). Diğeri ise ısıya duyarlı fosfolipaz C dir ve fosfolipidler üzerinde oluşturduğu çözücü etki ile akciğer yüzey gerilimini inaktive etmektedir. Fosfolipaz C'nin kistik fibrozlu hastalarda solunum yollarının kolonizasyonunda önemli bir rol oynadığı saptanmıştır. Kan kültüründen izole

edilen suşların, diğer kültürlerden izole edilen suşlardan daha fazla fosfolipaz C ürettikleri saptanmıştır (2, 17).

Ekzotoksin A, *P. aeruginosa* tarafından üretilen en önemli, virulans faktörlerinden biridir. Monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırması bu bakteri ile enfekte hastalarda oluşan kronik akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır. Ekzotoksin A, difteri toksini ile aynı intrasellüler etki mekanizmasına sahiptir ancak, neden olduğu enfeksiyon tipi farklılık göstermektedir. Bunun nedeni ekzotoksin A'nın, difteri toksininde görüldüğü gibi kana karışarak vücudun diğer bölümlerine yayılmayıp, yerel etki göstermesidir. Bakterinin oluşturduğu ekzotoksin A miktarı suşa bağlı olarak değişir ve toksin yapan suşlar bakteriyemik insan suşlarında daha virulandır (2, 17).

Ekzoenzim S ökaryotik hücrelerde bulunan bir veya birden fazla proteini modifiye etmektedir. Sadece ekzotoksin A veya ekzoenzim S oluşturan suşlara göre, her ikisini de oluşturan suşlarla enfekte olan hastalarda mortalite oranı daha yüksektir. Ekzoenzim S oluşturan suşlarla daha yüksek mortalitenin görülmesi, bu enzimin *P. aeruginosa*'nın etken olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarında gözlenen progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını göstermektedir (2,17).

Alkali proteaz ve elastaz proteazlar, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan en önemli virulans faktörleri arasındadır. Jelatini, kazeini, laminini ve immünoglobulinleri parçalarlar. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır. Proteazlar *P. aeruginosa* ile kronik olarak enfekte kistik fibrozlu hastalarda ilk savunma hattından kaçışında önemlidir. Bu kaçış mekanizması bakterinin üremesine,

çoğalmasına ve sonuçta kolonizasyon oluşturmaya neden olmaktadır (17).

P. aeruginosa'nın yüzeyinde pilus ve nonpilus olmak üzere iki adezin bulunmaktadır. Bu adezinler epitellere tutunmadan sorumludurlar. Piluslara bağlı tutunma, immün sistemi baskılanmış hastaların üst solunum yollarının ve hasar görmüş alt solunum yolu epitellerinin kolonizasyonunda önem kazanmaktadır. Enfeksiyon süreci ilk olarak bakterinin pilusları aracılığıyla yanak epiteli yüzeyindeki belirli reseptörleri tanıması ve yapışmasıyla başlamaktadır. *P. aeruginosa* kistik fibrozlu hastaların yanak epiteline normal kişilerinkinden daha iyi tutunabilmektedir. Hastaların tükürüğünde bulunan proteazlar hücre yüzeyinden fibronektini ayırmakta ve bu şekilde pilusların tanıdığı yanak epitel hücreleri ve trakeal epitel hücre yüzeyindeki reseptörler açığa çıkmaktadır. *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları hasar görmemiş normal trakeal epitel hücrelerine nonmukoid suşlardan daha fazla miktarda tutunabilmektedir. Pilusa bağlı tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önem kazanırken, aljinata bağlı tutunma, mukosilyer atılımın hasar gördüğü durumlarda, alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk basamağı oluşturmaktadır. Ancak burada epitel hücrelerinde belirgin bir hasar gerekmemektedir (2, 16, 17).

P. aeruginosa, bazen polisakkarit yapısında kapsül benzeri yapılar yapar. Hücre dışındaki bu yapıya slaym (slime) tabakası, glikokaliks veya mukoid ekzopolisakkarit denir. Bu yapı tekrar mannuronik asit ve glukuronik asitten oluşur ve aljinatla sonlanır. Aljinat, aminoglikozitlerin bakterisid etkisini inhibe eder. Bu karbonhidrat bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir, onu iyice tespit eder ve konak savunmasından (mukosilyer aktivite, fagositik hücreler, antikolar ve kompleman gibi) bakteriyi korur. Mukoid kökenlerin çoğu kistik

fibrozlu hastaların örneklerinden izole edilmiştir (13).

Tablo 1. *P. aeruginosa* 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri (13)

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

6. Yaptığı enfeksiyonlar:

P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olduğu için insanlarda birçok enfeksiyonun kaynağı olabilir. Ancak hastane kaynaklı enfeksiyonlar açısından daha önemli bir yere sahiptir. *P.aeruginosa* normalde sağlıklı kişilerin florasında bulunur ve bu kişilerde hastalık oluşturmaz veya nadiren hastalık oluşturur, ancak özellikle mukoid tipleri kistik fibrozlu hastaların yanı sıra, nötropeni, mekanik ventilator bağlı, kemoterapi, yanık ve AIDS gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve prematüre bebeklerde sıklıkla enfeksiyona neden olan önemli bir fırsatçı patojendir. Ayrıca bu hasta gruplarında yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonlar oluşturması ve çeşitli antibiyotiklere dirençli olması nedeniyle hastane enfeksiyonu etkeni olarak önem kazanmıştır (2, 5, 14). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (13).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezi bakterinin hem invazif hem de toksinojenik olması nedeniyle karmaşıktır. Enfeksiyonlar üç aşamada gerçekleşirler. Bu aşamalar;

1. Bakterinin tutunması ve kolonizasyonu,
2. Lokal invazyon,
3. Sistemik yerleşme ve sistemik hastalık şeklindedir (17).

Her basamak için bir önceki gereklidir, fakat hastalık herhangi bir basamakta durabilir.

P. aeruginosa'nın alt solunum yollu enfeksiyonları genelde konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında defektler olduğunda görülmektedir. *P. aeruginosa*'ya bağlı kronik akciğer enfeksiyonları, anormal solunum yolları sekresyonlarının olduğu genetik bir hastalık olan, kistik fibrozisli hastalarda genel

olarak görülür. Kistik fibroz olgularında gelişen bu enfeksiyonların patogeneğinde yatan temel neden, kistik fibroz transmembran regülatör geninde saptanan defektlere bağlı olarak gelişen ve epitel düzeyinde anormal klor iyonu transferi şeklinde eksprese olan bir metabolik bozukluktur (2, 5). Kistik fibroz olgularında görülen morbidite ve mortalitenin en başta gelen nedeni kronik bronkopulmoner kolonizasyon ve enfeksiyondur. Solunum yollarının ilk kolonizasyonu nonmukoid *Pseudomonas* suşlarıyla olmakla birlikte, bazı çevresel koşulların baskısı altında bu suşlar mukoid fenotipe dönüşerek akciğer enfeksiyonlarında dominant hale geçmektedirler. (2, 5, 16, 17). *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları kistik fibrozlu hastalarda bir yaşın altında %21 oranında, 26 yaşın üzerinde ise %80'e kadar yaşla birlikte artan oranda alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olur (2, 5).

P. aeruginosa protez kalp kapağı bulunan hastalarda protez kalp kapağına, ilaç bağımlılarında doğal kalp kapağına yerleşerek enfektif endokardite neden olabilmektedir. Triküspid kapak tutulumu daha sık olmakla birlikte pulmoner, aortik veya mitral kapak ve her iki atriyumun mural endokardiyumu tutulabilir (2, 17).

Yenidoğanda, bağışıklık ödüllü kişilerde, AIDS ve kanser hastaları gibi immunosupresif ilaç alan bireylerde, yara veya yanık enfeksiyonu gibi çeşitli lokal enfeksiyonlarını takiben bakteriyemi gelişebilir. *P. aeruginosa* sepsislerinde ölüm oranı çok yüksektir. Hastalık sırasında vezikül, bül ve sonunda ektima gangrenozum adı verilen, hemorajik ve nekrotik yaralar şeklinde gelişme gösteren döküntüler görülür. Bunların oluşumu kapiller damarlardaki *P. aeruginosa*'ların deriye lokalizasyonu ile olur (17).

Lomber ponksiyon ya da lomber anestezi sırasında bakterinin kontamine

iğne veya eriyiklerle BOS'a verilmesi sonucunda oluşan ağır pürülan menenjit gelişir. Septisemi sırasında kan yolu ile bakterinin meninkslere ulaşması da menenjite neden olabilmektedir (17).

Çeşitli yollarla bulaşan bakteriler yara ve yanıklarda lokal ve çoğu kez mavi yeşil renkte pü görülen enfeksiyonlara neden olur. Ağır yanıklarda deride hakim olan gram pozitif flora yerini gram negatif çomaklara ve özellikle *P. aeruginosa*'ya bırakır. Böylece yanık bölgesinde kolonize olan *P. aeruginosa* dokunun bir gramında 10^5 bakteri konsantrasyonuna ulaşır. Alttaki subkutan bölgeye geçip fibröz septa ve lenfatikler boyunca ilerleyip perivasküler dokuda çoğalarak kan dolaşımına geçer. Yanıklı hastalardaki *Pseudomonas* sepsisinde tedavideki tüm gelişmelere karşın mortalite %78 gibi çok yüksek bir orandadır (17).

Yatan hastalarda *P. aeruginosa* ile kontamine sonda veya sistoskop gibi aletlerin kullanılması sonucu sistit ve bakterilerin yukarı idrar yollarına ulaşmaları sonucunda nozokomiyal piyelit ve piyelonefrit gelişir (2, 5).

Penetran travma sonrası göze yabancı cisim ile veya kontamine damlaların damlatılması sonucu *P. aeruginosa* enfeksiyonları gelişebilir ve bazen görme kaybı ve endoftalmite neden olabilir. Kontamine kozmetik ürünleri, kontakt lensler ve lens solüsyonları sağlam gözde bile bu tür enfeksiyonların oluşmasına neden olabilmektedir. Yenidoğanda damlacık enfeksiyonları da bu sonuca ulaşabilir. Göz enfeksiyonları konjonktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit şeklinde gelişebilirler (2, 16, 17).

P. aeruginosa dış kulak yolu normal florasında ender olarak bulunur fakat yaralanma, maserasyon, enflamasyon veya sürekli nem ortamında eksternal otit

adı verilen ve kendiliğinden iyileşebilen tabloya neden olabilir. Ağırlıklı olarak yaşlı ve diyabetik kişilerde, kısmen de damar hastalığı olan kişilerde malin eksternal otit adı verilen tablo görülebilir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kulak enfeksiyonlarından biri de otitis media'dır. Hem malin eksternal otit hem de primer akut otitis media, mastoidite neden olabilmektedir (16, 17).

Entübasyon ve bronkoskopi gibi solunum yoluna ait invazif girişimlerden sonra *P. aeruginosa* ile alt solunum yolu enfeksiyonu gelişebilir. Bronkopnömonilerde lokal abseler gözlemlenir ve balgamda bol miktarda *P. aeruginosa* bulunabilir. *P. aeruginosa*, solunum veya immün sisteminde bozukluk olan kişilerde akut fatal bakteriyemik pnömoniye neden olabilir (16, 17).

P. aeruginosa enfeksiyonu kemik ve eklemlerde ya kan veya komşuluk yolu ile oluşur. Kan yolu ile oluşan enfeksiyonlar genellikle intravenöz ilaç bağımlılarında; üriner sistem veya pelvik enfeksiyonu takiben; komşuluk yolu ile enfeksiyon ise penetran travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku enfeksiyonu sonrasında gelişir (2,17).

P. aeruginosa orofarinksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde kolonizasyon yapabilir. Enfeksiyon en sık yenidoğanlarda, hematolojik malinitesi olanlarda ve kemoterapi gören nötropenik hastalarda ortaya çıkar. *Pseudomonas* sepsisi için gastrointestinal sistem önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (13, 17).

Yanık, travma, dekübit ülserleri veya dermatit ile bütünlüğü bozulmuş deride, nem de varsa, primer diffüz veya lokalize *Pseudomonas* deri lezyonları meydana gelebilir. *P. aeruginosa* bakteriyemisi sırasında da ektima gangrenosum denilen deri lezyonları gelişebilmektedir.(13, 17).

7. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler:

P. aeruginosa, pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik dirence sahiptir ve bakteri bu direnci ya farklı kromozomal mutasyonlarla veya plazmidler, transpozonlar veya integronlar aracılığıyla taşınan direnç genlerinin horizontal kazanımı sonucunda geliştirebilir. Bu nedenle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı duyarlılık deneyi sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem ve meropenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktamlar; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır (2, 5, 13, 17).

3.1.2. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter ilk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiş, 1939 yılında DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle tanımlanmıştır (18, 19). Deoksi ribonükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda 33 genomik tür tanımlanmıştır, 24 genomik türe isim verilirken diğer türler isimlendirilememiştir (3, 4). Genomik türlerden grup 1, 2, 3 ve 13TU benzerlik gösterip laboratuvarında zor ayırt edildikleri için *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmışlardır (19). *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* ve *A. lwoffii*, klinik literatürde en sık rapor edilen *Acinetobacter* türleridir (19). Tüm bu türler arasında en sık ve önemli klinik tablolara yol açan tür *A. baumannii*'dir (3, 5).

1. Morfoloji ve boyanma özellikleri:

Acinetobacter cinsindeki bakteriler üremenin logaritmik fazında kısa, iri, bazen renksizleştirme problemi yaşanan, gram negatif, 1,0-1,5 µm uzunluğunda basil, üremenin duraklama fazında kok veya kokobasil şeklinde görülmektedir. Fimbriaları vardır ve hareketsizdirler (3, 4).

2. Kültür ve biyokimyasal özellikleri:

A. baumannii kültür ortamında 35-37°C'de üreyebilen, nonfermentatif, genellikle düzgün, bazen mukoid, renksiz koloniler oluşturur. Zorunlu aerop, DNaz ve oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, nonfermantatif gram negatif mikroorganizmalardır. Diğer nonfermantatif bakterilerden ayırmada kullanılacak ilk test oksidaz testidir (3, 4, 19).

Acinetobacter türleri arasında en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir (19). Rutin laboratuvar koşullarında, biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır. Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44°C'de üreyebilen kökenler *A. baumannii*'dir (19).

Klinik laboratuvarlarda nonfermantatif mikroorganizmaların izolasyonunda genellikle kanlı agar ve eozin metilen blue agar gibi besiyerleri kullanılır. (3, 4, 19). Üç şekerli demirlibesiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (3, 4). Mac Conkey agar besiyerinde enterobakterilerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler oluştururlar. Klinik örneklerden üretilibilmeleri için seçici-ayırıcı besiyerleri geliştirilmiş olup bu amaçla en sık Herellea agar (Difco) ve Leeds *Acinetobacter* Medium

kullanılmaktadır. Kontamine örneklerden (dışkı, toprak) izole etmek içinde, asetat ve amonyum tuzu bulunan sıvı mineral besiyeri kullanılabilir (3, 4).

Rutin laboratuvar koşullarında *Acinetobacter* tür ayrımı biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre yapılmaktadır. Klinikte sık görülen türlerin ayrımına baktığımızda; glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44°C'de üreyebilen kökenler *A. baumannii*, glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 37°C'de üreyebilen kökenler *A. calcoaceticus*, glukoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayanlar *A. lwoffii*, hemoliz yapanlar ise *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır (3, 4, 19).

3. Virulans ve patojenite özellikleri:

Acinetobacter cinsi bakterilerde virülans düşük olduğundan konağın savunma mekanizması normal olması durumunda enfeksiyon oluşturması oldukça zordur. (3, 4). Dünya çapında salgınlara neden olan fırsatçı bir patojendir, özellikle solunum yolu ve yaralarda kolonize olmaktadırlar. *Acinetobakter* cinsi bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması, kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmeleri, çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajı nedeniyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilirler. İnsanda koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere derinin normal florasında yer alabilmekte ve sağlıklı bireylerin yaklaşık %25'inin derilerinde *Acinetobakter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir. *Acinetobacter* türlerinin hastane personelinin %15-33'ünde ellerinde kolonize olduğu, bu kökenleri hastalara ve ekipmanlara aktardıkları gösterilmiştir (20).

Acinetobacter türlerinin insanda yaygın olarak yaptığı enfeksiyonlar; genitoüriner sistem enfeksiyonları (kateter uygulamasına bağlı sistit ve

piyelonefrit gibi), intrakraniyel infeksiyonlar (cerrahi girişimlerden sonra görülen menenjit gibi), solunum sistemi infeksiyonları (intübasyon ve trakeostomi sonrası), yumuşak doku infeksiyonlarıdır (3, 4). *Acinetobacter* infeksiyonları sıklıkla hastane kaynaklı olmasına rağmen toplum kökenli alt solunum yolu infeksiyonlarından da izole edilmiştir (19).

Acinetobacter mekanik ventilasyon gereken yoğun bakım ünitesi hastalarında ventilatör ilişkili pnömoniye neden olmaktadır. Ventilatör bağımlı hastaların kontrolünde büyük ilerlemelere ve solunum ekipmanlarının dezenfeksiyonunda etkili yöntemlerin kullanımına rağmen insidansta artış görülmektedir (3, 4). Kronik akciğer hastalığı, yoğun bakım ünitelerinde yatış süresinin uzun olması, ileri yaş, immüsupresif tedavi, cerrahi, antibiyotik kullanımı, endotrakeal tüp ve gastrik tüp gibi invaziv alet varlığı, solunum ekipmanının tipi *Acinetobacter* ile alt solunum yollarının kolonizasyon veya enfeksiyon riskini arttıran faktörler olarak belirtilmiştir (19, 20). Ülkemizde yapılan bir çalışmada *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında %24 oran ile ilk sırada yer almıştır ve bu olguların çoğu ventilator ilişkilidir (19).

Acinetobacter enfeksiyonu sırasında sık görülen bakteriyemi, mortalitesi yüksek bir durumdur. *Acinetobacter* bakteriyemisi sıklıkla pnömoni ve damar içi kateter kullanımından sonra gelişmektedir. (19). Üriner sistem kateterizasyonu, deri ve abdominal enfeksiyonlar daha az sıklıkla kaynak oluşturur (20). Bakteriyemi için yetişkinlerde en büyük risk grubunu immün sistemi baskılanmış yaşlı hastalar oluşturur. Malignansiler, travma ve yanık en yaygın predispozan faktörler olarak görülmektedir. Yenidoğanlar *Acinetobacter* bakteriyemisi için ikinci önemli hasta grubunu oluşturur. Bakteriyemi için risk faktörleri düşük

doğum ağırlığı, mekanik ventilasyon, öncesinde antibiyotik kullanımı ve yeni doğan konvülsiyonlarının varlığı olarak tanımlanmıştır (3, 4).

Acinetobacter'lere bağlı menenjitler nadir görülen ancak mortalitesi %34-54 arasında değişen önemli enfeksiyonlardır. Primer menenjitli sporadik vakalar bildirilmesine rağmen özellikle beyin cerrahisi uygulamalarından sonra veya kafa travmasını takiben gelişen sekonder menenjit olguları görülmektedir. *Acinetobacter* türleri ile gelişen menenjit olgularında beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları pürülan menenjit özelliğindedir. Ventrikülostomi, serebrospinal sıvı kaçağı, BOS fistülleri, beş günden uzun süreli tutulan ventriküler kateterler ve aşırı antibiyotik kullanımı risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (3, 4).

Acinetobacter türleri ile oluşan hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonları nadir görülmektedir. Genellikle yaşlı, immün sistemi baskılanmış, sürekli üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gözlenebilir. Prostat büyümesi nedeniyle, sürekli kateter kullanımında yüksek prevalansa sahip oldukları için hastaların çoğunu erkekler oluşturur. Üriner kateter taşıyan hastalardan izole edilen her *Acinetobacter* gerçek enfeksiyon etkeni olmayabilir, enfeksiyon/kolonizasyon ayrımının yapılması gerekmektedir (3, 4, 19).

Acinetobacter ile oluşan yumuşak doku enfeksiyonlarında travmatik yaralar, yanık, cerrahi insizyon bölgeleri, damar içi kateter uygulamaları, bağışıklık sisteminin baskılanması başlıca risk faktörlerini oluşturur. Devamlı peritoneal diyaliz olan hastalarda peritonite neden olabilir. En yaygın tablo olarak karın ağrısı ve bulanık diyalizat görülmektedir. Hastaların çoğu diyalizi sonlandırmaya gerek kalmadan antibiyotik tedavisine yanıt vermektedir. Ayrıca

perkutan transhepatik kolanjiografi, perkutan safra drenajı sonrası enfeksiyon gelişen olgular bildirilmiştir (3, 4).

Acinetobacter ile gözde konjonktivit, endoftalmit, protez kalp kapağı endokarditi, lens kontaminasyonu sonucu korneal ülserasyon, perkutan transhepatik kolanjiografi ve perkutan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, pankreas ve karaciğer apseleri, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen osteomyelit, septik artrit ve perforasyon gibi enfeksiyonlarda neden olabilirler (3).

4. *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler:

Acinetobacter izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar, genelde geniş spektrumlu sefalosporinler, beta laktam \ beta laktamaz inhibitör kombinasyonları veya tek başına ya da aminoglikozidle kombinasyon halinde kullanılan karbapenemlerle tedavi edilmektedir (4). En sık kullanılan kombinasyon, düşük direnç oranları ve in vitro sinerji göstermesinden dolayı imipenem + amikasindir. Seftazidim + aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonu da etkili olabilir. İmipenem + siprofloksasin kombinasyonunun in vitro ve in vivo aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Sefoperazon + sulbaktam kombinasyonu *A. baumannii*'ye oldukça etkilidir (19).

İzole edilen *Acinetobacter* izolatlarının birçok antibiyotiğe dirençli olmasından dolayı tedavisi oldukça güçtür. (3, 4). Karbapenemler hala en etkili antibiyotikler olsa da hastane enfeksiyonlarında direnç %11'e ulaşmaktadır. İmipenem ve meropenem orta düzeyde dirençli *A. baumannii*'nin kullanıldığı in vitro çalışmalarda rifampisin + kolistin kombinasyonu sinerjik etkili bulunmuştur (19, 20).

3.2. Antibakteriyellerin etki mekanizmaları

Enfeksiyon hastalıklarının ilaçlarla tedavisi 17. yüzyılda başlamasına rağmen 20. yüzyılda Paul Ehrlich'in mikroorganizmalarla ilaçlar arasındaki özgül kimyasal ilişki, ilaç direnci ve kombine tedavide temel prensipleri belirlemesiyle kullanılmaya başlanmıştır. Antimikrobiyal ajanlar için geliştirilen bu kavramların tümü seçici toksik etki adı altında toplanır, yani antimikrobiyal ajanın miktarı ve türü mikroorganizmaya zarar verirken, konağa zarar vermemelidir (8).

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlara antibakteriyel veya antibiyotik adı verilir. Bazı antibiyotikler bakteri hücrelerini öldürürken (bakterisidal) bazıları üremeyi durdurucu (bakteriyostatik) etki gösterir.

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre beş genel gruba ayrılır.

1. Hücre duvarı sentezini engelleyenler
2. Protein sentezini engelleyenler
3. Nükleik asit sentezini engelleyenler
4. Folik asit sentezini engelleyenler
5. Hücre zarının işlevini bozanlar

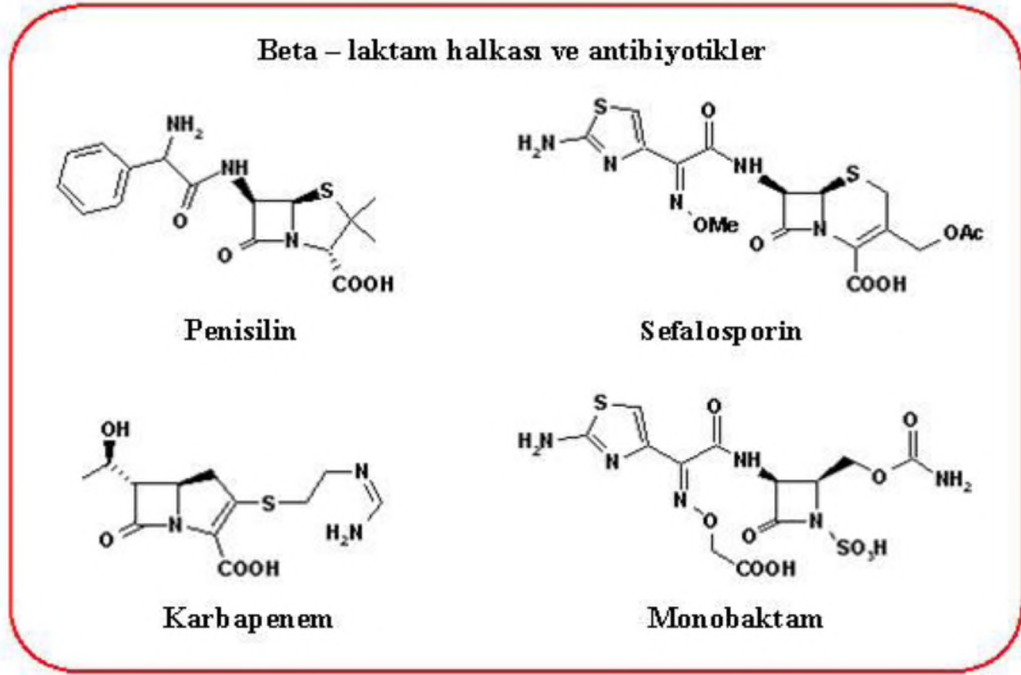
Bakteri hücrelerinin yaşamsal yapılarından biri olan hücre duvarı gram pozitiflerde peptidoglikan ve teikoik asitten, gram negatiflerde ise peptidoglikan ve dış membrandan oluşur. Hücre duvarı gücünü peptidoglikan yapısından alır. Peptidoglikan sentezi beş aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada, sitoplazmik membranın iç yüzündeki enzimler tarafından peptidoglikan öncülleri; üridin difosfo N asetilglukozaminden UDP N asetil muramik asit sentezlenir. İkinci aşamada sentezlenen bu öncüller sitoplazmik membranda bulunan bir lipid taşıyıcıya aktarılır, disakkarit pentapeptid üniteleri oluşturulur ve membranın dış

yüzüne taşınır. Üçüncü aşamada yeni peptidoglikan ünitesi hücre duvarındaki önceki peptidoglikan zincire eklenir. Dördüncü aşamada transpeptidasyon reaksiyonları ile peptidoglikan zincirler arasında çapraz bağlar oluşur ve en son aşama aslında ikinci aşamanın devamıdır, taşıyıcı lipitten bir fosfat uzaklaştırılır. Hücre duvarı sentezini engelleyen antibakteriyellerin tümü peptidoglikan sentezinin değişik basamaklarını etkiler. Hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklerin başında beta laktam ajanlar ve glikopeptitler gelir (8, 11, 12).

Protein sentezini engelleyen antibiyotikler 50S alt üniteyi bağlayan antibiyotikler (makrolidler, kloramfenikol, ketolidler, streptograminler), 30S alt üniteyi bozanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler) olmak üzere iki gruptan oluşur. Nükleik asit sentezini etkileyen antibiyotikler; DNA replikasyonunu bozanlar (kinolonlar), RNA replikasyonunu bozanlar (rifamisinler) ve DNA yapısını bozanlar (metronidazol) olmak üzere üç grupta toplanır (8).

3.3. Beta laktam antibiyotikler

Beta laktam antibiyotikler, hücre duvar sentezini engelleyen ve yapılarında bir beta laktam halkası bulunan, günümüzde gerek hastane içinde, gerekse hastane dışında en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Beta laktam antibiyotikler hücre duvarı sentezinin dördüncü aşamasında yer alan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe ederek hücre duvar sentezini durdururlar. Beta laktamlar, kimyasal yapılarındaki ortak bir beta laktam halkası ve bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir (şekil 1) (8, 36).



Şekil 1. Beta laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı

Beta laktam antibiyotikler başlıca 5 gruba ayrılır: Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar, Karbapenemler, Beta laktam inhibitörleri

3.3.1. Penisilinler

Penisilin, ilk kez 1928’de Fleming tarafından *Penicillium notatum* kültüründe elde edilmiş daha sonra 1940 yıllarında Florey ve Chain çalışmaları sonucu saflaştırılarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır (8, 21, 22, 36).

Temel yapısında bir tiazolidin halkası bir beta laktam halkasından bulunan 6-aminopenisilanik asit nükleusuna sahip doğal ve semisentetik antibiyotiklerdir. Doğal penisilinler *Penicillium spp.*’den elde edilir. Yan zincirdeki değişiklikler ilacın antibakteriyel ve farmakokinetik özelliklerinde değişikliğe neden olur. Penisilinler bakterisidal etkiye sahiptirler.(21, 22). Penisilinler antibakteriyel aktivitelerine göre altı gruba ayrılır.

1- Doğal penisilinler: penisilin G, prokain penisilin G, kristalize penisilin G,

benzatin penisilin G, penisilin V (Fenoksi metil penisilin)

2- Penisilinaza dirençli penisilinler (semisentetik): metisilin, nafsilin, izaksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin), oksasilin

3- Aminopenisilinler: ampisilin, amoksisilin, bakampisilin

4- Karboksipenisilinler (Pseudomonaslara etkili penisilinler): karbenisilin, indanil karbenisilin (korindasilin), tikarsilin

5- Üropenisilinler (pseudomonaslara etkili penisilinlere): azlosilin, mezlosilin, piperasilin

6- Beta laktam inhibitörlü kombine penisilinler: ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat, tikarsilin/klavulonat, piperasilin/klavulonat

Penisilinler gram pozitiflerin büyük bir çoğunluğuna, gram negatiflerin çoğunluğuna ve anaerobik mikroorganizmalara etkilidir. Penisilin G; penisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, viridans streptokoklar, *Streptococcus bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, anerobik koklar, *Clostridium* türleri, *Fusobacterium* türleri, *Prevotella* türleri ve *Porphyromonas* türlerine çok etkilidir. Fakat son zamanlarda dünyada penisilin dirençli pnömokoklarda artış görülmektedir (22). Penisilin sifiliz ve *Actinomyces* enfeksiyonlarında seçilecek bir ilaçtır. Penisilin V daha az etkili olduğu *N. gonorrhoeae* dışında penisilin G'ye benzer etki spektrumuna sahiptir. Prototipi metisilin olan penisilinaz dirençli penisilinler esas olarak penisilinaz meydana getiren stafilokoklara etkilidir (21, 22). Stafilokokların %90'ından fazlası salgıladıkları penisilinaz enzimi ile penisilinleri inaktive ederler. Penisilinaz dirençli penisilinler, penisilinaz meydana getiren stafilokoklara karşı diğer penisilinlerden 25 kat daha etkilidirler. Gram

negatif enterik bakterilerden yalnızca meningokok ve gonokoklara etkilidir ayrıca *Bacillus anthracis*, Clostridium türleri ve spiroketlere de etkilidir.

Aminopenisilinlerin etki spektrumu penisilin G'ye benzerdir, fakat buna karşın enterokoklar ve *Listeria monocytogenes*'e daha etkilidirler. *Haemophilus influenzae* ve *Haemophilus parainfluenzae*'ya çok etkili olmalarına rağmen *H. influenzae* izolatlarının %35'den çoğu beta laktamaz ürettiği için dirençlidir. *Salmonella enterica* serovar Typhi de dahil olmak *Salmonella* ve *Shigella* türlerine, *Escherichia coli* suşlarının çoğuna ve *Proteus mirabilis* bu ajanlara duyarlıdır (8, 21, 22).

Ampisilin *Shigella*'ya daha etkili iken amoksisilin *Salmonella*'ya daha etkilidir. Bu ajanların her ikisi de beta laktamazlar tarafından inhibe edilir ve çoğu *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* türlerine etkisizdirler. Ayrıca *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* türleri ve *Bacteriodes fragilis*'lerin çoğu penisilinlerin bu sınıfına dirençlidir (21, 22).

Karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlerinler doğal penisilin ve aminopenisilinlerin etkisiz olduğu gram negatif bakterilere daha fazla etkilidir. Bu ajanlar *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* beta laktamazlarına dirençlidirler. Üropenisilinler, streptokok ve enterokoklara karboksipenisilinlerden daha fazla etkilidirler ve karboksipenisilinler, *Klebsiella* türlerine karşı inaktif olmalarına karşı üropenisilinler, *Klebsiella* türlerinin %75'ten fazlasında etkilidirler. Üropenisilinler, *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinin çoğuna ve anaerob bakterilere mükemmel etki ederler. Karboksipenisilinler, enterokoklara etkisiz olmalarına karşın bu ajanlara karşı aminoglikozidlerle sinerjistik olarak etki edebilirler. *Pseudomonaslara* etkili penisilinler; piperasilin ve azlosilindir. Bu

penisilinlerin gram pozitif bakterilere etkinlikleri, penisilin G ve aminopenisilinlerden daha azdır ve beta laktamazlara dirençli değillerdir (8, 36).

Beta laktamaz inhibitörlerinden hem doğal olan klavulanik asit, hem de yarı sentetik olan sulbaktam ve tazobaktam zayıf antibakteriyel etkiye sahiptirler. Bunların asıl etkinlikleri, beta laktamazların aktif bölgelerine dönüşümsüz olarak bağlanarak beta laktamazları inhibe etmeleri ile olur. Günümüzde klinikte kullanılan dört kombinasyon vardır. Bunlar; amoksisilin+klavulanik asit, ampisilin+sulbaktam, tikarsilin+klavunat ve piperasilin+tazobaktam kombinasyonlarıdır. 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 (8, 36).

3.3.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler, *Cephalosporium acremonium* adı verilen küf mantarı ekstraksiyonundan izole edilmiştir. Bunlar beta laktam halkası ve dihidrothiazin halkasından oluşan 7 aminosefalosporanik asit çekirdeğine sahiptir. (Şekil 1). Sefalosporinlerde beta laktam halkası yanında, penisilindeki 5 üyeli tiazolidin halkası yerine 6 üyeli bir dihidrothiazin halkası bulunur. Farmakokinetik özellikleri ve antibakteriyel aktiviteleri 3 ve 7. pozisyondaki değişikliklerde farklılaşır. Beta laktam halkasındaki 7. pozisyona metoksi grup eklenmesiyle beta laktamazlara yüksek derecede dirençli olan sefamisinler olarak bilinen yeni bir grup oluşur. Farmakolojik özellikleri, bakterilere karşı etkileri, kimyasal yapıları aynı olduğu için sefalosporinler arasında ele alınırlar (21, 22). Kronolojik esasa dayanan ve

bakterilere karşı etki spektrumlarına göre sefalosporinler 4 grupta sınıflandırılabilir:

1. kuşak sefalosporinler dar spektrumlu antibiyotikler olup, yalnızca sefazolinin stafilokoklara etkinliği biraz daha az, gram negatif etkinliği diğer 1. kuşak üyelerine göre biraz daha fazladır. Penisilin duyarlı ve dirençli *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve diğer aerobik ve anaerobik streptokoklara etkilidirler. Metisilin dirençli *S. aureus*, *S. epidermidis* ve enterokoklar dirençlidir. *P. mirabilis*, *Klebsiella* türleri ve bazı *E. coli* türlerini içeren *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri duyarlıdır. *Pseudomonas* türleri (*P. aeruginosa* dahil), bazı *Proteus* türleri, *Serratia* ve *Enterobacter* türleri dirençlidir. *B. fragilis* grup dışındaki penisilin duyarlı anaeroblara etkilidir (8, 21, 22)

2. kuşak sefalosporinler, genişletilmiş spektrumlu antibiyotikler olup, gram negatif bakterilerde bulunan bazı beta laktamazlara karşı dirençli ve bunun sonucu olarak gram negatif organizmalara karşı artmış aktiviteye sahiptir. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* türleri ve anaerob patojenlere karşı daha etkili *Pseudomonas* türlerine karşı etkisizdir.

3. kuşak sefalosporinler, 1. Kuşak sefalosporinlere göre gram pozitif koklara daha az etkili, 2. Kuşak sefalosporinlere göre *Enterobacteriaceae* ve *pseudomonas aeruginosa*'ya daha çok etkilidirler. Ayrıca *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, indol (+) *Proteus*, *Providencia* ve *Serratia*'ya karşı etkilidirler. Anaeroblara karşı etkileri değişik derecededir. (10). 3. Kuşak sefalosporinlerin gram negatiflere karşı geniş spektrumlu olmaları beta laktamazlara karşı dirençli olmaları ve gram negatif basillerin hücre duvarlarından kolayca geçebilmelerinden kaynaklanır (8).

Sefepim ve sefpirom Bush class I beta laktamazlara karşı artmış dayanıklılıkları olan ve benzersiz özellikleri olan dördüncü kuşak (genişlemiş spektrum) sefalosporinlerdir. Bu antibiyotikler *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae'nin* dereprese class I beta laktamazlarına karşı da etkilidirler. Ek olarak sefepim ve sefpirom gram negatif bakterilerin dış membranına iyi penetre olurlar. Buna karşı anaeroblara veya enterokoklara klinik olarak etkisizdirler (21, 22).

3.3.3. Monobaktamlar

Monobaktamlar, doğal monosiklik beta laktam antibiyotiklerdir. Günümüzde klinikte kullanılan tek monobaktam antibiyotik, aztreonamdır. Monobaktamlar, yapısında bulunan beta laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta laktamlardan ayrılırlar. Aztreonam gram negatif aerobların PBP 3'üne bağlanarak bakteri hücre duvar sentezini bozduğundan güçlü gram negatif etkinliğe sahiptir. *Pseudomonas aeruginosa'*ya da etkilidir, ancak gram pozitif bakterilere ve anaeroplara etkili değildir. Bu nedenle ciddi hastalarda ampirik tedavide tek başına kullanılmamalıdır. Aminoglikozitler gibi toksik olmayışı ve penisiline alerjisi olan hastalarda kullanılabilmesi birer avantajdır (21, 22).

3.3.4. Karbapenemler

Karbapenemler, en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahip antibiyotik sınıfıdır. Kromozomal AmpC ve GSBL enzimlerine dirençlidir. Hem geniş spektrumlu olmaları, hemde beta laktamaz enzimlerine dirençli olmalarından dolayı özellikle çoklu dirençli gram negatif bakteri infeksiyonlarında yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak, son yıllarda direnç oranlarının artması sonucu

tedavide yaygın kullanımları azalmıştır (21). Karbapenemler, bir toprak organizması olan *Streptomyces cattleya* tarafından yapılan tienamisin türevleridir. Temel yapıları penisilinin laktam halkasına benzemekle beraber bazı farklılıklar vardır ve karbapenemlerin pek çok beta laktamaz enzimine dirençli oluşunun nedeni hidroksietil yan zincirindeki farklı *trans* konfigürasyonudur. Bu konfigürasyon sadece faropenemde farklılık göstermekle birlikte diğer üyelerinin hepsinde aynıdır. Bu nedenle son olarak CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) karbapenem sınıfı ilaçları "karbapenemler" ve "penemler" olarak iki alt gruba ayırmıştır. Penem alt grubunda yalnızca faropenem yer almaktadır. Karbapenem alt sınıfında ise imipenem, meropenem, ertapenem ve yeni geliştirilmekte olan doripenem vardır (6, 21, 22).

Küçük farklılıklar dışında karbapenemler genellikle benzer antibakteriyel etkiye sahiptir. Aerobik gram pozitif stafilocoklar (penisilin duyarlı ve dirençli izolatlar), viridans streptokoklar, grup A, B, C ve G streptokoklar, *Bacillus* türleri ve *L. monocytogenes*'e mükemmel etki gösterirler. İmipenemin gram pozitif bakterilere meropenem ve ertapenemden 2-4 kat daha etkilidir, fakat metisilin dirençli stafilocoklar tüm karbapenemlere dirençlidir (22).

Karbapenemler, Gram negatif aerob bakterilerden *Enterobacteriaceae* ailesine, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının çoğuna, beta laktamaz yapan *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoea* ve *Mycobacterium avium intracellulare* suşlarına etkilidir. Meropenemin gram negatiflere etkisi imipenemden daha fazladır. Bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olan imipenemin gram pozitif, gram negatif, aerob ve anaerob mikroorganizmalara etkinliği vardır. Bu mikroorganizmaların çoğu için MİK 4 mg/L'nin altındadır.

Enterobacteriaceae ve non fermentatif gram negatif bakteriler için sınır MİK değerleri Tablo 2’de görülmektedir. Karbapenemler anaerobik gram pozitif koklar, *Clostridium*, *Bacteroides fragilis* grubu, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* ve *Prevotella gibi* anaerob türlere karşı en güçlü beta laktamlardır ve bu aktiviteleri en az klindamisin ve metronidazol kadardır (22, 24).

İmipenem ve meropenem ciddi nozokomiyel enfeksiyonların tedavisi için kullanılması gereken antibiyotikler iken, ertapenem *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarına etkinliğinin yeterli olmaması nedeniyle şiddetli toplumsal kökenli enfeksiyonlar için kullanılmalıdır. Direnç gelişimin önleminde yaygın kullanımlarından kaçınmak gereklidir. Son yıllarda hastanelerden karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları ile salgınlar bildirilmektedir (8).

Tablo 2: Doripenem, ertapenem, imipenem ve meropenemin *Enterobacteriaceae* ve non fermentatif gram negatif bakteriler için MİK değerleri

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

3.3.5. Beta laktamaz inhibitör kombinasyonları

Beta laktamaz inhibitörleri, yapılarında beta laktam halkası taşıyan ve bundan dolayı beta laktamlara çok benzeyen ancak tek başlarına kullanıldıklarında etkileri olmayan veya az olan maddelerdir. Günümüzde kullanılan beta laktam kombinasyonları; ampisilin+sulbaktam, amoksisilin+klavulanik asit,

sefoperazon+sulbaktam, piperasilin+tazobaktam, tikarsilin+klavulanik asittir (21).

a. Klavulanik asit: Antibakteriyel etkisi zayıf bir maddedir ve *Streptomyces clavuligerus* kültüründen izole edilmiştir. Stafilokoklar ve diğer gram negatif bakterilerin ürettikleri beta laktamazları inhibe eder. Beta laktamaz ile birleşip, geri dönüşümsüz açil enzim kompleksi oluşturarak beta laktamaz enziminin beta laktam antibiyotigini parçalamasını önler. Beta laktam antibiyotik ile beraber kullanıldığında sinerjistik etki gösterirler (21).

b. Sulbaktam: Antibakteriyel etkisi zayıf, semisentetik bir 6 dezaminopenisilin sulfon'dur. Beta laktamaz enzimini inhibe eder. Penisilin ve sefalosporinlerle sinerjistik etkiye sahiptir.(21).

c. Tazobaktam: Penisilanik asit sulfon türevi olan tazobaktam yapısal olarak sulbaktama benzer. Tek başlarına antibakteriyel etkisi zayıf olduğu için çeşitli beta laktam antibiyotiklerle kombine olarak kullanılır (21).

3.4. Antibakteriyellerin direnç mekanizmaları

Bir bakterinin, antimikrobiyal bir ajana karşı öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğine direnç denir. Bakterilerde antibiyotiklere direnç gelişmesi ile antibiyotik kullanımı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Antibiyotik kullanımının daha fazla olması ve antibakteriyel ajanlarla kontamine olmasından dolayı hastaneler dirençli bakteriler için uygundur. (1,11, 12). Bu nedenle, bakterilerdeki direnç oranı, hastane enfeksiyonlarında daha fazladır. Bu oran hastanedeki bölümlere göre de farklılık gösterebilir, örneğin yoğun bakım ünitelerinde saptanan enfeksiyon etkeni bakterilerde direnç daha yüksek olabilmektedir (1). Bunun bir nedeni, bu bölümlerde antibiyotik kullanımının daha fazla olmasıdır. Bakterilerdeki direnç mekanizmaları dört

başlıkta toplanabilir. Bunlar;

1- Hücrede antibiyotik miktarının azaltılması; dış membran geçirgenliğinin azaltılması, iç membrandan geçişin engellenmesi veya aktif atım pompası ile olabilir.

2- İlacın hedefinde değişiklik olması; mutasyon veya enzimatik değişiklikler sebep olabilir.

3- Sentezlenen enzimlerin ilacı inaktive etmesi

4- Antibiyotikten etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması

Bir mikroorganizmanın yapısı nedeniyle antibiyotiklere karşı dirençli olmasına yapısal (intrinsik) direnç denir. Bu direnç bir türün bütün üyelerinde görülür. Örneğin, gram negatif bakterilerin çoğunun vankomisin ve metisiline yapısal olarak dirençli olmaları gibi. Kazanılan (edinsel) direnç ise bakterinin kendi düzenleyici veya yapısal genlerindeki bir mutasyonla, başka bir bakteriden direnç genlerinin edinilmesiyle veya bu mekanizmaların ikisi birden yol açabilir. Mutasyonlar hem kromozomal DNA'da oluşmakta hem de plazmid veya transpozonlardaki genlerde olabilmektedir. (1, 7, 11, 12).

Kromozomal direnç; kromozomda spontan mutasyon oluşmasına bağlıdır ve klinikte bu tip direnç çok nadirdir. Kromozomal mutasyon sonucu oluşan edinsel direnç dikey evrim olarak tanımlanır. Antibiyotiklerin bakteri hücreindeki hedefleri, hücrenin yaşamsal proteinlerdir. Kromozomal mutasyonlar, antibiyotiğin hedefinden başka, bakterideki düzenleyici genlerde de oluşabilmektedir. Buna en iyi örnek *P. aeruginosa*'da OmpD porininin ifadesinin azalması ile imipeneme direnç oluşması ve atım pompalarının etkisidir (11, 12).

Bakterinin dirençli bir mikroorganizmadan genetik madde alarak direnç

kazanması yatay evrim olarak tanımlanır. Bu geçiş hem aynı türler arasında hem de farklı tür ve cinsler arasında olabilir. Genetik madde geçişi konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon yoluyla olabilir. Bakterinin başka bir bakteriden genetik madde alması plasmid, transpozon veya bakteriyofaj aracılığı ile olur. Plazmidler, kromozomlardan bağımsız olarak replike olmalarına karşılık, transpozonlar bağımsız olarak replike olamazlar. Klinikte görülen daha çok plazmidlere bağlı dirençtir (1, 7, 9, 11, 12). Özellikle hastane gibi yoğun antibiyotik kullanılan yerlerde direnç genlerini taşıyan bakterilerde artış görülmesi, bu direncin transfer edilebilir olmasından kaynaklanmaktadır. Transpozonlar, bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizileridir. Kromozom veya plazmid içinde bulunmakta, bunlar arasında yer değiştirebilmektedir. Ayrıca bazı transpozon veya plazmidlerde, integron adı verilen ve yeni genlerin kazanılmasını sağlayan genetik yapılar bulunmuştur. Bir bakterinin, çok kısa bir süre içinde bir çok antibiyotiğe birden çoğul dirençli duruma gelişine, integronların sebep olduğu anlaşılmıştır (7,11, 12).

Direnç genlerinin bakteriler arasında geçiş yollarının en basiti, transformasyondur. Bakteriler, başka bir bakterinin lizisi sonucunda ortaya çıkan çıplak DNA moleküllerini alarak, bakteri kromozomuna yeterli homoloji gösteren bölgelere rekombinasyon ile kendi DNA'larına katmaları olarak tanımlanır. Buna en iyi örnek *Streptococcus pneumoniae*'daki penisilin ve sefalosporin direncidir. Ancak birçok bakteri, doğal transformasyon yapamadığı için daha sık olarak konjugasyon yoluyla genetik madde geçişini yapar. Konjugasyon yoluyla direnç geninin aktarımı transpozon, integron ve daha çok plazmidler aracılığı ile olur. Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen kromozom dışı

genetik yapılarıdır. Bazı plazmidlerin konak açısından çok özgül olmasına karşın, bazıları birçok farklı tür bakteriye girip replike olabilmektedir. R-plazmidi adı verilen direnç plazmidleri, sayıları 10'a varan farklı antibiyotiğe direnç gösteren, genleri taşıyabilirler ve bu genleri duyarlı bakterilere taşıyarak onların dirençli hale gelmesine neden olurlar. Plazmidler, transpozon ve integron gibi direnç elemanları için bir araç görevinde yaparlar. Transpozonlar bağımsız olarak replike olamadıklarından plazmid, kromozom veya bakteriyofaj içinde bulunurlar. Plazmidler arasında direnç genleri genelde transpozonlar tarafından taşınmaktadır. Bunlar direnç genlerini, plazmitten plazmide, plazmitten kromozoma ya da kromozomdan plazmide taşıyabilmektedir. Bazı transpozonlar bakteriden bakteriye kendileri geçebilirler, bunlara konjugatif transpozonlar denir. Ancak bunlar çoğunlukla gram pozitif bakterilerde gözlenmektedir. İntegronların yapısında integraz enzimini kodlayan bir gen, gen kasetleri ve gen kasetlerinin yerleştiği bir integrasyon bölgesi bulunur. Direnç integronları ve süperintegronlar olmak üzere iki grup integron vardır. Direnç integronları antibiyotiklere direnç kodlar, kaset sayısı 10'dan azdır ve bakteri kromozomu, plazmid veya transpozon üzerinde bulunurlar. Süperintegronlar ise türe özgü, farklı işlevleri kodlayan, bakteri kromozomuna yerleşmiş 100'ün üzerinde gen kasetinden oluşabilir. Antibiyotik direnç genlerini kodlayan beş integron sınıfından en çok görülen sınıf 1'dir. Direnç geninin bakteriler arası geçişinde en az görülen transdüksiyondur. Transdüksiyonda direnç genleri bakteriyofaj aracılığı ile bir bakteriden diğerine geçmektedir (1, 7, 24, 25).

3.5. Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan üç farklı direnç mekanizması vardır.

- 1- Hedef penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) oluşan değişiklikler sonucu oluşan direnç
- 2- İlacın hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç
- 3- Beta laktamaz enzimleri ile oluşan direnç (1, 11, 12, 24).

3.5.1. PBP'lerde oluşan değişiklikler sonucu oluşan direnç

Bu mekanizma klinikte yaygın değildir ve PBP'nin aşırı sentezi sonucu oluşur. Buna en iyi örnek PBP4'ü aşırı sentezleyen *Staphylococcus aureus* izolatlarında metisilin direncidir (1). Bu direnç için meydana gelen mekanizmalar;

Beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yabancı PBP'lerin edinilmesi:

S. aureus'daki metisilin direnci en iyi örnektir. Duyarlı *S. aureus* suşlarında PBP2 ve PBP3, peptidoglikan sentezinde rol oynayan penisilin bağlayan proteinlerdir. *MecA* geni tarafından beta laktam antibiyotiklere afinitesi düşük olan bir PBP (PBP2a) sentezlenmesi ile metisilin direnci oluşur. PBP2a proteini PBP2 ve PBP3'ün işlevini yürütebilmekte, ayrıca tüm beta laktam antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. Bu nedenle metisiline dirençli olan suşlar tüm beta laktamlara dirençlidir. Hastane kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* izolatları florokinolonlar, makrolidler, aminoglikozidler, tetrasiklin, rifampin ve fusidik asit gibi diğer grup antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterebilmektedir. Bugüne kadar çoklu dirençli *S. aureus* izolatlarının

toplumdakilerden farklı olduğu gözlenmiş, çoklu direncin hastanede bulunan suşlarda geliştiği ve yayıldığı saptanmıştır (1,11, 12).

Beta laktam antibiyotiklerin afinitelerinin yüksek veya düşük olduğu PBP ile rekombinasyon yapması:

Doğal transformasyon yapan türlerde, duyarlı bir türün PBP'ler ile daha az duyarlı bir türden alınan PBP'ler arasındaki rekombinasyon yapması sonucu oluşur. Buna en iyi örnekler; *S. pneumoniae*, viridans streptokoklar, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*'dir. *S. pneumoniae*'de gözlenen penisilin direnci bu mekanizma ile oluşmaktadır. Değişmiş bu PBP'leri kodlayan genler pnömokoklarda "mozaik gen" olarak tanımlanmaktadır (1, 11,12).

PBP'lerdeki nokta mutasyon sonucu beta laktam antibiyotiklere afinitenin azalması:

Bu tip direnç en sık *E. faccium* suşlarında PBP5'lerinde gözlenmektedir ve penisilin direncine neden olmaktadır. Mutasyonların çoğu beta laktamların bağlanma bölgelerine yakın bölgelerde oluşmaktadır. *Haemophilus influenzae*'da PBP3A veya PBP3B'deki nokta mutasyonları sonucu ampisilin direnci oluşmaktadır (1).

3.5.2. İlacın hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç

Bu direnç ya antibiyotiğin hücre içine yeterli alınmamasından veya hedefe ulaşmadan dışarı atım sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanır (1, 24, 32).

Dış membran protein (OMP) ifadesinde azalma:

Antibiyotikler etki gösterebilmek için öncelikle hedeflerine ulaşmaları gereklidir. Örneğin, beta laktam ajanlar PBP'lere bağlanabilmek için sitoplazmik

zarın dış yüzüne ulaşmaları gerekir. Ancak, gram negatif bakterilerin dış zarları yarı geçirgen özelliğinden dolayı antibiyotiğin içeri alınmasını engeller. Bu nedenle gram negatiflerde küçük hidrofilik moleküller dış zardan küçük, içi su dolu kanalcıklar olan porinler aracılığı ile geçebilirler ve porinlerdeki değişiklik veya porin kaybı antibiyotiğin girişini engeller. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Beta laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler içerdikleri için porin proteinlerdeki değişimlerden etkilenmektedir. Örneğin, *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OmpD kaybı sonucunda bu antibiyotik sınıfına karşı direnç gelişmektedir. Yine *Escherichia coli* suşlarında dış membran porinlerinden OmpF ve OmpC kaybı ise beta laktam MİK değerlerinde 8-16 kat artış görülmektedir (1, 24, 32).

Porin kaybının tek başına beta laktam antibiyotik direncine sebep olması nadirdir. Bu nedenle beta laktam antibiyotik direncine neden olan ikinci bir yol daha vardı ve bu atım pompa sistemidir. Örneğin *P. aeruginosa*'da beta laktam antibiyotik direncine neden olan bir "atım pompası" mekanizması tanımlanmıştır (1, 24, 32).

Atım (eflüks) pompaları:

Atım pompa sistemleri antibiyotiklere duyarlı ve dirençli tüm mikroorganizmalarda bulunmakta, mutasyonlar sonucunda antibiyotiklere direnç oluşturmakta ve hücrenin amfilik olan ilaçlardan (örneğin antibiyotikler) korunmasını sağlamaktadır (1, 24). Son yıllarda bir çok bakteride çoklu antibiyotik direncine neden olan, plazmid veya kromozom kontrolünü çeşitli atım pompaları tanımlanmıştır. Bu atım pompaları beta laktam antibiyotiklerinde

aralarında bulunduğu birçok antibiyotiğe karşı gelişen doğal veya kazanılmış dirençte önemlidir (24).

Atım pompa sistemleri bakterilerde 5 grupta toplanmaktadır (1). Bunlar; ABC (ATP-binding cassette), MF (majör facilitator), SMR (small multidrug resistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) ve RND (resistance nodulation division) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları sitoplazmik membranda yerleşmiş tek bileşenli taşıyıcılardır ve substratlarını membranda yakalayarak dışarı atmaktadır. Gram negatif bakterilere özgü olan RND taşıyıcıları ise üç bileşenlidir. Bu üç bölümlü pompada sitoplazmada yerleşmiş bir pompa proteini, bir dış membran proteini (Omp) ve membran füzyon proteini (MFP) adı verilen bir periplazmik protein bulunmaktadır. Örneğin *P. aeruginosa*'da enerjiye bağımlı stoplazmik membran proteini (MexB, MexD veya MexF), dış membranda bulunan, por oluşturan ve dış membranda çıkış yolu sağlayan protein (OprM, OprJ veya OprN) ve periplazmik boşlukta bulunan protein (MexA, MexC veya MexE) diğer iki protein arasında bir bağlantı oluşturmaktadır (1,7, 11).

MDR (multiple drug resistance) alım pompaları, antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlar gibi yapısal olarak birbiriyle ilişkisiz farklı bileşikleri tanıyarak hücreden atan membran transport proteinleridir.

3.5.3. Beta laktamaz enzimlerinin oluşturduğu direnç

Beta laktam antibiyotiklere karşı klinikte en çok görülen dirençler, bakterilerin beta laktamaz enzimlerini sentezlemesi ile oluşmaktadır. Bu enzimler beta laktam halkasındaki siklikamid bağını parçalayarak, beta laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldırırlar. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve

karbapenemler, beta laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından inaktive edilebilirler.

Beta laktamazlar, gram pozitif bakterilerde doğrudan dış ortama salınırlar (1, 11, 12, 24). Gram pozitif bakteriler içinde beta laktamaz sentezleyen en önemli patojen *S. aureus* 'tur. Gram pozitif bakterilerde, beta laktamaz enzimleri plazmid kontrolündedir ve bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı hücrelere geçebilmektedir. Gram negatif bakterilerde ise beta laktamazlar, dış membran ile stoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır. Bu nedenle Gram negatif bakteri türlerinde dirençten sorumlu beta laktamazlar, sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol almaktadır. Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere, Gram negatif bakterilerin beta laktam direncindeki en önemli mekanizmadır (1,7, 11, 12, 24). Beta laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir. Gram negatif bakterilerde, beta laktamaz enzimleri kromozom, plazmid veya transpozonların kontrolündedir (12).

İntegronlar *bla* genlerin yayılımının önemli bir kaynağıdır. Ambler'in A, B ve D gruplarına ait beta laktamazları taşıyan integronları *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve diğer gram negatif bakteri türlerinde bulunmuştur (1, 10, 24). İntegronlarda taşınan beta laktamazlar VEB-1, VEB-2, GES-1, GES-2, IBI-1, CTX-M-2, CTX-M-9, PSE-1 ve çeşitli OXA beta laktamazlardır. Karbapenemlere direnç oluşturan OXA ve metallo enzimler de (IMP-1, 2, 3 ve IMP-4, IMP-8, 9, 10, 11, IMP-12, VIM-1, VIM-2, ve GIM-1) integronda taşınan beta laktamazlardır (1, 10, 15, 24, 34).

Tablo 3. Bush-Jacoby ve Ambler'e göre Beta laktamazların sınıflandırılması

Beta laktamaz grupları	Moleküler sınıf (Ambler)	Lokasyon	Substrat	Klavulanik asit inhibisyonu	ETDA inhibisyonu	Örnek enzimler
1	C	Kromozom plazmid	Sefaloprinler	-	-	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri; MIR-1
2a	A	plazmid	Penisilinler	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Kromozom plazmid	Sefaloprinler, penisilinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Kromozom plazmid	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefaloprinler, monobaktamlar	+	-	TEM-3 ile TEM26, SHC-2 ila SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	plazmid	Penisilinler	+, -	-	TEM-30 ila TEM- 36, TRC-1
2c	A	çeşitli	Penisilinler, karbenisilin	+	-	PSE-1,3, 4
2d	D	çeşitli	Penisilinler, oksasilin	+, -	-	OXA-1 ila OXA-11,PSE-2 (OXA-10)
2e	A	çeşitli	Sefaloprinler	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Kromozom plazmid	Penisilinler, sefaloprinler, karbapenemler, monobaktam	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A sı OXA-24, 26, 40, 51, 58, 72
3	B	çeşitli	Monobaktamlar hariç tüm beta laktamlar	-	+	<i>Bacteroides fragillis</i> 'in CcrA'sı VIM, IMP , SPM, GIM
4	belirlenmemiş		Penisilinler			<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nin penisillinazı

3.6. Beta laktamazların sınıflandırılması

Günümüzde, substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından farklı, 900'e yakın beta laktamaz tanımlanmıştır (1).

Bu enzimler, kullandıkları substratlara, biyokimyasal özelliklerine, gen dizilerine, keşfedildikleri yerlere, genlerin kromozom üzerindeki yerlerine, bakteri cinsine, örneğin izole edildiği hastaya ve son olarak enzimi tanımlayan araştırmacıya göre isimlendirilebilmektedirler. Beta laktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros veya Ambler sınıflandırılması kullanılmaktadır (1, 7, 10,11, 83).

Ambler tarafından yapılan sınıflandırma, enzimleri kodlayan nükleotidlerdeki aminoasit dizilerinin benzerliğine dayanan moleküler sınıflandırmadır (Ambler, 1980). Bu sınıflandırmaya göre beta laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört grupta toplanmaktadır (1, 7, 9, 83).

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, öncelikle penisilinleri hidroliz eden beta laktamazlardır. Gram negatiflerde en sık bulunan TEM-1 enzimi en iyi bir örnektir.

Sınıf B: Aktif bölgelerinde çinkoya içeren kromozomal bir enzimlerdir. Penisilin ve sefalosporinlerin yüksek hidrolizine sahip diğer beta laktamazlarla aynı bölümde yer alırken 1990'da plazmid kaynaklı bir MBL olan IMP-1 tanımlanmış ve bu grup üzerindeki düşünce değişmiştir (74).

Sınıf C: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC olarak da adlandırılan enzimlerdir. Bu enzimleri üreten organizmaların sayısı göz önünde

bulundurulduğunda en yaygın beta laktamazlar arasındadır. Düşük üretildiklerinde sadece sefalosporinlerin antibakteriyel aktivitelerini bozarken, yüksek seviyede diğer beta laktamların aktivitelerini bozabilirler.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta laktamazlardır.

Bush-Jacoby-Medeiros 1995 yılında beta laktamazları hem biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre, hem de penisilin, oksasilin, karbenisilin, sefaloridin, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler ve imipeneme karşı hidrolitik spektrumları ve klavulanik aside duyarlılıklarını esas alarak 1'den 4'e kadar gruplandırmışlardır.

Grup 1 beta laktamazlar (AmpC beta laktamazlar):

Çoğu kromozomal olan, moleküler sınıf C, bu grup beta laktamazlardır. *Salmonella* ve *Klebsiella* dışında hemen tüm gram negatif bakterilerde sentezlenmektedir. Ancak miktarı, sentez yolu ve dirence etkileri açısından farklılıklar göstererek yüksek veya düşük düzeyde üretilebilir. Kromozomlarda kodlanan (ve indüklenebilen) enzimler özellikle *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens*'in klinik izolatlarında önemlidir. Bu gruptaki beta laktamazlar plazmidlerde de görülebilmektedir ancak bunların indüklenebilir özellikleri yoktur. Plazmid kontrolündeki grup 1 beta laktamazları dünyanın her yerinde birçok gram negatif bakteride tanımlanmıştır. Bu enzimleri içeren konak suşlar *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *S. enterica* serotip Enteritidis ve Senftenberg, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* ve *Klebsiella oxytoca*'dır. Plazmid kontrolünde AmpC enzimleri içeren klinik izolatlarda porin proteinlerinin kaybedilmesi karbapenemlere dirence yol açabilir (1, 7, 10, 12, 23,

24). Grup 1 beta laktamazlar klavulanik asit ve sulbaktam ve tazobaktamdan etkilenmezler, buna karşı aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Karbapenemlere karşı da duyarlıdırlar (1, 9). Bu enzimler normalde bakteri tarafından bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken penisilin ya da sefalosporin gibi bir antibiyotik ortama eklendiğinde enzimin sentezinde artışa neden olabilir (23, 24). Değişik oranlarda olmak üzere farklı beta laktam antibiyotikler Grup 1 beta laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici beta laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski seviyesine 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. Beta laktamaz taşıyan bu 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 (7, 9, 23, 24).

Grup 2 beta laktamazlar

Tümü moleküler sınıf A ve D'de yer almaktadır. Penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar (1). 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 (7, 11, 12).

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *S. aureus*'un enzimleri, *Bacillus cereus*'un kromozomal beta laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır (1, 9, 11, 12).

2b: Bu gruptaki beta laktamazlar klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamlara duyarlıdırlar, hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize ederler (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 ve *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunurlar. *E. coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine en sık TEM-1 beta laktamazları neden olur. 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. (1, 11, 12).

2be: TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerde, Oksiamino beta laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM ve SHV enzimleri gelişmiştir (7, 11, 12). Bu yeni beta laktamazlar GSBL (genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar) olarak isimlendirilir. Bu enzimler sefalosporin ve aztreonamların gelişiminden kısa bir süre sonra tanımlanmıştır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle

Klebsiella ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Plazmid kökenli ve çoklu antibiyotik direnci gösterirler. Türler arası transfer edilebilirler. İlk başta ESBL SHV ve TEM beta laktamazlarının bir türeviyken, 10 yıl içinde tüm dünyada, CTX-M beta laktamazları TEM ve SHV kaynaklı ESBL'lerin yerine geçmiştir (72, 73). İlk iki CTX-M enzimleri 1990 yıllarında Batı Avrupa ve Güney Amerika'da tanımlanmış (71). Bu grupta ilk kez Türk izolatlarında saptanan enzimlerden biri olan PER-1 seftazidime çok dirençli, seftazidim-klavulonik asite çok duyarlıdır. ESBL, hala beta laktam dirençli büyük salgınlara sebep olmaktadır.

2br: TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ile TRC-1 enzimi bu gruptadır. Bu beta laktamazlar klavulanik asitten etkilenmeyen geniş spektrumlu beta laktamazlardır.

2c: PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Vibrio cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır. Bu beta laktamazlar karbenisilini hidroliz ederler ve klavulanik asite duyarlıdırlar.

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 grupta oksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden OXA grubu beta laktamazlar vardır. Tüm grup 2d beta laktamazlar amino ve karboksipenisilinleri büyük ölçüde hidrolize eder (1, 10, 11, 12). Klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olmaları ve hastane kökenli suşlardan izole edilmelerinden dolayı önemli bir gruptur. OXA tipi enzimlerden iki alt sınıf önem taşımaktadır; birincisi özellikle Türkiye kökenli *P. aeruginosa* suşlarında görülen GSBL türevleri, ikinciside özellikle *A. baumannii*

suşlarında görülen, karbapenemleri hidrolize eden türevleridir. Bu enzimlerin karbapenemaz aktiviteleri modifiye Hodge testi ile gösterilebilir (11, 12).

2e: Bu gruptaki beta laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 ve *B. fragilis*'in CepA enzimi, *Bacteriodes uniformis* ve *Bacteriodes vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA enzimleri bu grupta yer almaktadır (7, 10, 11, 12, 24).

2f: Karbapenemlerin çoğunu hidroliz edebilir. Bu kromozomal enzim grubunun ilk raporu Batı Amerika ve Londra'da Enterobakter suşlarında görülmüş ve 10 yıl sonra Boston ve Chichago'da küçük salgınlar şeklinde görülmüştür. İlk plazmid kaynaklı serin karbapenemaz olan KPC ABD'de rapor edilmiştir. Günümüzde KPC enzimlerini *Acinetobacter spp.* ve *P. aeruginosa* suşlarında görmek mümkündür (75, 76). Klavulanik asit ile inhibe olan *Enterobacter cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens*'in SME-1 enzimi de bu grupta yer almaktadır (7, 10, 11,12, 24).

Grup 3: Moleküler sınıf B'de yer alan metallo beta laktamaz (MBL) enzimleri:

Hem yapısal hemde işlevsel olarak farklı bir beta laktamaz grubudur. Bu beta laktamazlar diğerlerinden farklı olarak aktif bölgelerinde bir Zn iyonu bulundurlar. 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 inhibitörlerine dirençlidirler. Bu beta laktamazlar a, b, c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar (24,

31).

3a: Bu enzimler; penisilinleri, karbapenem ve sefalosporinlerden daha hızlı olarak hidrolize ederler. Bu grup içerisinde *Bacillus cereus* II, *B. fragilis*'in CcrA, *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *Chryseobacterium indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un BlaB enzimleri yanısıra, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Shigella flexneri*, *K. pneumoniae* gibi değişik türlerde saptanan IMP-1-8 ve *P. aeruginosa*'da saptanan VIM-1-3 enzimleri yer almaktadır. Plazmid kaynaklı MBL ailelerinin başlıcaları bu grupta yer alır (1, 24, 31).

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, yani nitrosefin hidrolizine dayalı testlerle gösterilemez (1, 24, 31).

3c: Bu grupta sadece *Legionella 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 (1, 24, 31).

Edinsel MBL'lere en son eklenen enzimlerden biri olan ve Hindistan'dan kaynaklandığı düşünülen, Yeni Delhi MBL (NDM-1), kıtalararası yayılım göstermesiyle büyük bir kaygı yaratmıştır. Bu enzim, *K. pneumoniae* ve *E. coli* başta olmak üzere, birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde ve *Acinetobacter spp.*'de saptanmıştır (24).

Grup 4:

Bu grubu, klavulanik asit ile iyi inhibe olmayan küçük penisilinazlar oluşturur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. *Alcaligenes faecalis*, *B. fragilis*, *Campylobacter jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta laktamazı bu gruba dahil edilmiştir. *Pseudomonas cepacia*'daki beta laktamazlar da bu gruptadır. Yapıları tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir (7, 24, 31).

Bu dört 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. Günümüzde özellikle gram negatif bakterilerde görülen; grup 1 sefaloporinazlar, grup 2be GSBL ve grup 3 metallo beta laktamazlar klinikte yaygın olarak görülmekte ve tedavide sorunlara yol açmaktadır. Beta laktamazların prevalansı ülkeden ülkeye, şehirden şehire hatta hastaneler arasında bile değişiklik gösterir (11, 12)

3.7. Karbapenemlere direnç mekanizmaları

Karbapenemlerin GSBL ve kromozomal Amp C beta laktamaz enzimlerine dirençli olmaları ve geniş etki spektrumlu olmalarından dolayı ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en önemli antibiyotiklerdir (1, 6, 26, 30). Ancak, karbapenemlerin özellikle empirik tedavide yaygın kullanılması bunlara karşı direnç oranlarının artmasına neden olmuştur. Karbapenemlere karşı 3 direnç mekanizması gelişebilir (26, 29, 30). Bunlar;

1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması:

a. Porin değişimleri: Bu, özellikle *P. aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD kaybı, bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişmektedir. Bir haftalık imipenem tedavisi sonunda *P. aeruginosa* suşlarının %50'sinde oprD geninde mutasyonlar olduğu saptanmıştır. OprD kaybı tipik olarak imipenem direncine ve azalmış meropenem duyarlılığına sebep olur. Fakat OprD kanallarını kullanamayan diğer beta laktamlar üzerine etkisi yoktur. *P. aeruginosa*'daki duyarsızlık, ayrıca çoklu ilaç eflüks pompası (MexA-MexB-OprM)'nin mutasyonel sayı artışına bağlı olarak ortaya çıkarılabilir. Bu mekanizma meropenem, penisilin, sefalosporin, kinolon, tetrasiklin ve kloramfenikol için geçerli fakat imipenem için geçersizdir (26, 27, 29, 30). Porin kaybıyla ve kromozomal AmpC beta laktamazlarının aşırı üretimi ile oluşan imipenem direnci *Enterobacter spp.*'de tanımlanmıştır. *K. pneumonia*'da ise porin kaybına bağlı ve plazmid aracılıklı AmpC beta laktamazın (ACT-1) varlığıyla direnç oluşur.

b. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi:

2. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı:

a. İntrinsik (kromozomal) karbapenemazlar: Bu grupta, *B. cereus II*, *B. fragilis*'in CcrA, *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *C. indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un BlaB enzimleri sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan MBL'lardır. Karbapenem hidrolize eden, beta laktamaz genlerinin çoğu kromozomal olarak kodlanır. Bu durum bu enzimlerin yavaş yayılımını ve böylece karbapenemlere karşı beta laktamaz

aracılıklı direncin artmasının yavaş olmasını sağlamıştır (29, 30).

b. Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenemazlar: Bu enzimler nonfermentatif bakteriler ve tüm *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde görülürler. Bunlar 4 sınıftan oluşur;

A sınıfı karbapenemazlar: Serin karbapenemazlardır, klavulanik asitle inhibe olurlar ve enderdirler. Bu gruptaki enzimler IMI, NMC-A, SME, KPC ve GES'dir, *P. aeruginosa*'da nadir olmak üzere, tüm *Enterobacter*'lerde görülürler. Bunlar, imipenem, meropenem, penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama direnç gelişmesine neden olan ve tazobaktam başta olmak üzere beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimlerdir (6, 27, 29, 30). KPC geninin şimdiye kadar 10 türevi (KPC-2, 11) bilinmektedir, plazmitte yerleşik Tn4401 transpozonu ile ilişkilidir ve bu durum bu genin yayılımından sorumlu olabilir (76, 81).

B sınıfı metalloenzimler: Metallo beta laktamazlardır ve klinik açıdan en önemli karbapenemazlardır. Aztreonam dışındaki tüm beta laktamları hidrolizleyen IMP, VIM, GIM, SPM, NDM-1, IND enzimleri içerirler. Genellikle *Enterobacter*'ler, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*'de görülürler. Metallo beta laktamaz üreten bakteriler genellikle penisilinlere, sefalosporinlere, karbapenemlere ve beta laktamaz inhibitörlerine dirençli olarak saptanırlar (6, 27, 29, 30).

C sınıfı beta laktamazlar: Kromozomal AmpC enzimlerinin aşırı üretiminin, özellikle dış membran porin değişimleri ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açması büyük olasılıkla en yaygın karbapenem direnç mekanizmasıdır (6, 30).

D sınıfı oksasilinazlar: D sınıfındaki karbapenemazlar *Acinetobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae* ailesinde rastlanan ve karbapenemlere düşük düzeyde direnç

ya da azalmış duyarlılığa yol açan oksasilinazlar, yani OXA tipi enzimlerdir (6, 30, 33). D sınıfı karbapenemazlar;

3. 1. alt grup: OXA-23, OXA-27 ve OXA-48

4. 2. alt grup: OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40

5. 3. alt grup: OXA-58

6. 4. alt grup: OXA51/69 olmak üzere 4 alt grupta toplanmışlardır.

3. Hedef PBP değişimleri:

Tek başına nadir görülür ancak diğer mekanizmalar ile birlikte etkilidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Çalışmada kullanılan bakteri örneklerinin toplanması

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TF. 13. 17 numaralı proje ile destek sağlanarak yapılmıştır. Mart 2011-Mart 2012 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen rutin örneklerden imipenem ve/veya meropenem dirençli yaklaşık 50 *P. aeruginosa*, 50 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya alınmıştır. Toplanan suşlar boncuklu tüpler (Cryoinstant, Deltalab, İspanya) içersine alınarak çalışma başlayıncaya kadar -80 °C'de (Sanyo, Japon) saklanmıştır.

4.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve EDTA hazırlanışı

1. Eosin metilen blue agar (EMB):

Eosin methylene blue agarın (Oxoid, İngiltere) toz besiyerinden 37,5 gr alınarak 1000 ml distile su içinde iyice çözülene kadar ısıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 100 ml steril petri kutularına aktarılmıştır. Katılaşması için oda sıcaklığında tutulduktan sonar, kullanılana kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

2. Mueller-Hinton Agar:

Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) toz besiyerinden 38 gr 1000 ml distile su içinde iyice çözülene kadar ısıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 100 ml steril petri kutularına aktarılmıştır. Katılaşması için oda sıcaklığında tutulduktan sonra, kullanılana kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3. EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) solüsyonunun hazırlanışı

Ticari olarak hazır alınan toz halindeki disodium EDTA (Sigma) 18,61 gr. tartılarak 100 ml'lik steril distile suda çözdürülmüş daha sonra NaOH ile pH 8'e ayarlanarak 0.5 Molar EDTA elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu çözelti steril bir şekilde ağzı kapatılarak saklanmıştır (37).

4.3. Bakterilerin tiplendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının tiplendirmeleri konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle ve otomatize sistem ile yapılmıştır. Tanımlamak için gram boyasına göre Gram negatif, oksidaz negatif olan koloniler, üç şekerli demirli besiyerine (TSİ) ekimleri yapılarak glukozdan asit ve gaz oluşturma, sukroz ve laktoza etkileri ve H₂S oluşturma özellikleri, indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer, sitrata ve üreye etkileri konvansiyonel yöntemlerle tiplendirilmiş, tiplendirilen bakteri örnekleri Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) Tam Otomatize İdentifikasyon cihazı ile doğrulanmıştır.

4.4. Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri

Bakterilerin invitro koşullarda antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıp değerlendirilmiştir. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testleri için ticari olarak elde edilen imipenem (10µg) (Oxoid) diskleri kullanılmıştır. Kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. Çalışmaya alınacak *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları EMB besiyerine ekilerek, 35-37°C'de, 18-20 saat etüvde inkübe edilmişlerdir. Bu taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri, pamuklu swap yardımıyla toplanarak steril serum fizyolojik tuzlu su

içerisinde, 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteri emdirilmiş pamuklu swap, 100 mm çapındaki plaklara dökülmüş Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine, plağı tamamen kaplayacak şekilde sürülmüştür. Plaktaki nemin kaybolması için 5-6 dakika bekletildikten sonra antibiyotik diskleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine uygun şekilde steril pens ile besiyeri yüzeyine yerleştirildikten sonra, plaklar 35-37°C'de, 18-20 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası antibiyotik disklerinin zon çapları, CLSI standartlarına göre ölçülerek, dirençlilik (≤ 19) orta derecede duyarlılık (20- 22), ve duyarlılık (≥ 23) durumları kaydedilmiştir. Bu antibiyogram sonuçları aynı zamanda Phoenix 100 (Becton Dictinson, USE) Tam Otomatize İdentifikasyon cihazı ile doğrulanmıştır. Beta laktamaz üretimine bağlı karbapenem direnci, özellikle, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* kökenlerine bağlı hastane infeksiyonlarında önemli bir sorun olduğu için disk difüzyon yöntemiyle imipeneme ve/veya meropeneme dirençli olarak değerlendirilen suşlarda karbapenem enzimi varlığı, kombine disk testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge fenotipik testleri ile araştırılmıştır.

4.5. Karbapenemazların fenotipik yöntemlerle identifikasyonu

4.5.1. Kombine disk sinerji testi

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına yayılarak, plak içerisine iki tane imipenem (10 µg) diski, diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde ayarlanarak yerleştirilmiştir. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olan 0.5 M EDTA solüsyonundan 10 µl eklenerek 35-37°C'de, 18-20 saat inkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.

EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm olan şuşlar, beta laktamaz pozitif kabul edilmiştir (38, 39).

4.5.2. Çift disk sinerji testi

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldıktan sonra plak üzerine imipenem (10 µg) diski yerleştirilmiştir. İmipenem diskinin merkezinden 20 mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilerek, boş disk üzerine 0.5 M EDTA solüsyonundan 10µl eklenmiştir. 35-37°C’de, 18-20 saat inkübasyon sonrasında imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilmiştir ve bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları beta laktamaz pozitif kabul edilmiştir (38, 39).

4.5.3. Modifiye Hodge testi

İmipeneme duyarlı olan *E. coli* ATCC 25922 standart şuşundan taze pasaj yapıldıktan sonra, bu pasajdan 0.5 Mc Farland standardına uygun hazırlanan süspansiyonlar, Mueller Hinton agar plaklarına yayılır. 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterileri, plağın merkezinden periferine doğru düz çizgi şeklinde ekilir ve oda ısısında 15 dakika bekledikten sonra plağın ortasına imipenem (10 µg) diski yerleştirilmiştir. Plaklar etüvde 35-37°C’de, 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 şuşu imipeneme duyarlı olduğu için, duyarlılık zon çapının çizgi ekimi yapılan bakteri taraflarında yonca yaprağı şeklinde bozulması ve bu bölgede *E. coli* üremesi beta laktamaz varlığı yönünden, test edilen bakteri pozitif kabul edilmiştir (29, 38, 39, 55).

4.6. Direnç genlerinin araştırılması

İmipenem ve/veya meropenem dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, *bla_{OXA}* grubu (*bla_{OXA-51}*, 58, 23, 24), *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{VM}* direnç genlerinin olup olmadığının araştırılması, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle, görüntülenmesi agaroz jel elektroforez yöntemiyle yapılmıştır. Pozitif bulunan elektroforez sonuçlarının doğrulaması ve gen bölgelerinde görülen direnç gelişimine yol açan mutasyonların belirlenmesi, DNA dizi analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.6.1 DNA ekstraksiyonu

Çalışmada DNA ekstraksiyonu için QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, version 1 (QiagenGmbH, Almanya) ve otomatize QIASymphony SP/AS instruments (QiagenGmbH, Almanya) sistemi kullanılmıştır. Muller Hinton agara ekimi yapılan suşlar, 35-37°C'de, 18-24 saat inkübasyonun sonrasında kit prosedürüne göre hazırlanarak, cihazda DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra örnekler -20°C'de saklanmıştır.

4.6.2. PCR için kullanılan çözeltiler ve tamponlar:

dNTP (Deoksinükleotid trifosfat): Her biri 100 mM olan dATP, dGTP, dCTP, dTTP lerin her birinden 8 µl alınarak üzerine 368 µl RNaz ve DNaz içermeyen su ilave edilerek 2 mM konsantrasyon elde edilmiştir ve küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır (Biomatik).

Taq DNA polimeraz: Taq DNA polimeraz 5 U/µl olarak üretici firmadan alınmıştır (Biomatik). (İçeriği; Taq DNA polimeraz (5U/µl), 10x (25mM) MgCl₂'lü PCR buffer, 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 25 mM MgCl₂)

PCR için kullanılan Primerler ve baz dizileri: Ticari olarak satın alınan

primerler, (Bio Basic Canada Inc.) liyofilize halde bulunmaktadır. Sulandırma işlemi, protokolüne uygun olarak yapılarak, 100 pM'lük konsantrasyonlar elde edilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı ve Referans No	Primer dizisi	Amplikon boyutu
OXA-23- F (40)	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	501 bp
OXA-23- R	TCACAACAACATAAAAGCACTG	
OXA-24- F (40)	TTCCCCTAACATGAATTTGT	246 bp
OXA-24- R	GTAATAATCAAAGTTGTGAA	
OXA-51- F (41)	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353 bp
OXA-51- R	TGGATT GCACTTCATCTTGG	
OXA-58- F (43)	GCTGAGCATAGTATGAGTCG	691 bp
OXA-58- R	AAGCAAATGCCACCACTTGC	
KPC-F (42)	TCGCTAAACTCGAACAGG	785 bp
KPC-R	TACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	
VIM-F (42)	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382 bp
VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
IMP-F (42)	GAGTGGCTTAATTCTCRATC	120 bp
IMP-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	

4.6.3. PCR ile hedef gen bölgelerinin çoğaltılması

PCR amplifikasyon mastermiks protokolü; 32 µl Distile su, 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer R-F (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl) ve 5 µl DNA olmak üzere toplamda final konsantrasyonu 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

1. *bla*_{OXA-23} gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Valenzuela ve ark. (40) tarafından tanımlanan, 501 bç'lik ürün oluşturan, OXA-23-F GATGTGTCATAGTATTCGTCG, OXA-23-R TCACAACAACATAAAAGCACTG primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına konulmuştur (2720 Thermal cycler Applied Biosystems). Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısı 56°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla_{OXA-23}* gen bölgesi belirlemek amacı ile %2'lik agaroz jel hazırlanarak jel elektroforezi uygulanmıştır.

2. *bla_{OXA-24}* gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Valenzuela ve ark. (40) tarafından tanımlanan, 246 bç'lik ürün oluşturan OXA-24-F TTCCCCTAACATGAATTTGT, OXA-24-R GTACTAATCAAAGTTGTGAA primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına (2720 Thermal cycler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1

dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısı 52°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla_{OXA-24}* gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

3. *bla_{OXA-51}* gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Turton ve arkadaşları (41) tarafından tanımlanan, 353 bp'lik ürün oluşturan OXA-51-F TAATGCTTTGATCGGCCTTG, OXA-51-R TGGATT GCACTTCATCTTGG primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına (2720 Thermal cycler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısı 56°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla_{OXA-51}* gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

4. *bla_{OXA-58}* gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Andrea ve arkadaşlar (43) tarafından tanımlanan, 691 bp'lik ürün oluşturan OXA-58-F

GCTGAGCATAGTATGAGTCG, OXA-58-R AAGCAAATGCCACCACTTGC primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına (2720 Thermal cycler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısısı 58°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla*_{OXA-58} gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

5. *bla*_{KPC} gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Monteiro ve ark. (42) tarafından tanımlanan, 785 bp'lik ürün oluşturan KPC-F TCGCTAAACTCGAACAGG, KPC-R TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına (2720 Thermal cycler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısısı 56°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası

bla_{KPC} gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

6. *bla_{IMP}* gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Monteiro ve ark. (42) tarafından tanımlanan, 120 bç'lik ürün oluşturan, IMP-F GAGTGGCTTAATTCTCRATC ve IMP-R AACTAYCCAATAYRTAAC primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp, termal cycler cihazına (2720 Thermal cycler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısısı 56°C 1 dakika ve 72°C' de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla_{IMP}* gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile agaroz %2'lik jel elektroforezi uygulanmıştır.

7. *bla_{VIM}* gen bölgesinin amplifikasyonu:

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarından elde edilen ekstraksiyon ürünleri, Monteiro ve ark. (42) tarafından tanımlanan, 382 bç'lik ürün oluşturan VIM-F GTTTGGTCGCATATCGCAAC, VIM-R AATGCGCAGCACCAGGATAG primerleri amplifikasyon işlemi için kullanılmıştır. Toplam karışım 50 µl olacak şekilde; 5 µl 10X MgCl₂'süz PCR buffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2 mM), 2 µl Primer F-R (20 pmol), 0,2 µl Taq-Polimeraz (5U/µl), 5 µl DNA, 32 µl distile su PCR tüplerine dağıtılıp,

termal cyler cihazına (2720 Thermal cyler Applied Biosystems) konulmuştur. Cihaz 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, primer için bağlanma ısısı 58°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 36 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası *bla_{VM}* gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

4.6.4. Amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi

Elektroforez tamponu (5X TBE-Jel ve tanklar için tampon):

27 g Tris baz (Sigma), 13,75 g Borik asit (Himedia) ve 10 ml EDTA (0.5M pH: 8.0) üzeri deiyonize su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır (37).

Etidyum bromür (EB):

10 mg/ml olarak hazırlanmıştır. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun süre çözülerek, +4°C'de ışıktan uzakta saklanmıştır (Sigma).

Yükleme tamponu (Loading buffer):

6X DNA Loading Dye üretici firmadan (GeneON) alınmıştır.

DNA marker:

50 bp ve 100 bp DNA markerleri üretici firmadan hazır bir şekilde alınmıştır. (GeneON, Fermantes)

Agaroz jelin hazırlanması:

%2 oranında agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz (Sigma) tartılarak üstüne 90 ml 1X TBE tamponu eklenerek ısıtıcıda jel eriyene kadar bekletilmiş, daha sonra 40-50°C'ye soğutulup, içine 2-3 µl etidyum bromür ilave edilmiştir. Jel, kenarları kapatılan jel kaseti üzerine taraklar yerleştirildikten sonar, sızıntı

olmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılmış, tank içine tampon ilave edilerek ve örnekler jele yüklenmiştir.

Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi:

%2 lik agaroz jel tanka yerleştirildikten sonra, üzerine 1X elektroforez tampon konulmuştur. Jelde açılmış, kuyucuklara, 10 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra yerleştirilmiştir. Tankın kapağı kapatılarak elektrotlar güç kaynağına bağlanarak elektroforez cihazında (Thermo SCIENTIFIC) 150 voltta 45 dakika elektrik akımına tabi tutularak moleküler boyutlarına göre DNA bantlarının ayrışması sağlanmıştır. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transillüminatör (Benchtop 3UV™ Transilluminator) üzerine alınarak UV (ultra viyole) ışığı (~254 nm) altında fotoğrafı çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, molekül ağırlık standardı ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlenmiştir.

4.7. Sekanslama

Mevcut çalışmada, agaroz jel görüntüleme sonuçlarına göre, PCR pozitif bulunan örneklerin doğrulanması amacıyla, belirli sayıda pozitif örnekle, sekanslama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 20 klinik örneğe (5 örnek OXA-23, 8 örnek OXA-51 ve 7 örnek OXA-58) ait PCR ürünlerinin her birinin F ve R primerleri ile çift yön sekanslanması, otomatik sekans cihazı (REF-GEN, Ankara) kullanılarak yapılmıştır. Her örneğin F ve R primerleri ile elde edilen sekans dizilimlerinin "Chromas Lite 2.01" programı kullanılarak birleştirilmeleri sonucunda elde edilen dizilimler, önce BLAST programı ile (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankasında bulunan dizilimlerle kıyaslanmıştır (alignment). Daha sonraki adımda ise bu dizilimlerin gen bankasında mevcut

bakteri dizilimler ile filogenetik ilişkisinin (filogenetik ağaç) tespiti, “Bitişik-Bağlantı (Neighbor-joining) Metodu” temelli hazır program (PHYLIP computer program) kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik programda maksimum dizilim farklılığı 0.75’e göre hesaplanmıştır.

4.8. İstatistik analiz

Üzerinde durulan kategorik değişkenler için tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Gruplar ile Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede ise Ki-kare testi yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 ($p < 0,05$) olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

5. BULGULAR

Mart 2011-Mart 2012 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına, çeşitli kliniklerden gelen örneklerden izole edilen, imipenem ve/veya meropenem dirençli yaklaşık 50 *P. aeruginosa*, 50 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan 50 *A. baumannii* ve 50 *P. aeruginosa* suşlarının her ikisinde, en fazla yoğun bakım ünitesinden gelen örneklerden izole edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,02$). Örneklerin izole edildikleri ünitelere göre dağılımı Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Klinik izolatların hastane ünitelerine göre dağılımı

	<i>A.baumannii</i> n (%)	<i>P.aeruginosa</i> n (%)	TOPLAM n =100
Anestezi	0 (%0)	2 (%4)	2 (%2)
Dahiliye	2 (%4)	0 (%0)	2 (%2)
Gastroenteroloji	1 (%2)	1 (%2)	2 (%2)
Göğüs Hastalıkları	1 (%2)	7 (%14)	8 (%8)
Kardiyoloji	2 (%4)	0 (%0)	2 (%2)
Nöroloji	1 (%2)	0 (%0)	1 (%1)
Nöroşirürji	2 (%4)	0 (%0)	2 (%2)
Ortopedi	4 (%8)	3 (%6)	7 (%7)
Pediyatri	6 (%12)	3 (%6)	9 (%9)
Üroloji	0 (%0)	1 (%2)	1 (%1)
Yenidoğan yoğun bakım	8 (%16)	1 (%2)	9 (%9)
Yoğun Bakım	23 (%46)	32 (%64)	55 (%55)
TOPLAM n (%)	50 (%100)	50 (%100)	100 (%100)

A. baumannii suşları en fazla trakeal aspirasyonu ve yara kültürlerinden izole edilmiş *P. aeruginosa* suşları ise en fazla solunum sekresyonu kültürlerinden izole edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) *A. baumannii*

ve *P. aeruginosa* suşlarının klinik materyallere göre dağılımı tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının gelen klinik materyallere göre dağılımı

Gönderilen materyaller	linik <i>A.baumannii</i> n (%)	<i>P.aeruginosa</i> n (%)
Ampiyem	1 (%2)	0 (%0)
Balgam	2 (%4)	0 (%0)
BOS	5 (%10)	0 (%0)
İdrar	6 (%12)	3 (%6)
Kan	8 (%16)	7 (%14)
Katater	0 (%0)	1 (%2)
Plevral maii	1 (%2)	0 (%0)
Solunum sekresyonu	6 (%12)	29 (%58)
Trakeal aspirasyonu	11 (%22)	2 (%4)
Yara	10 (%20)	8 (%16)

Çalışmadaki *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında CLSI kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin sonucunda, *A. baumannii* için aztreonam, ceftazidime, ciprofloxacın, gentamicin, imipenem, piperacilin tazobactam %100 oranında dirençli tespit edilmiştir. Amikacin (%4) ve levofloxacın (%2) dışında hiç bir antimikrobiyal ajan duyarlı bulunmamıştır. *P. aeruginosa* için ise imipenem (%96) ve aztreonam (%90) en fazla dirence sahipken, piperacilin tazobactam (%56), amikacin (%22) ve ceftazidime (%22) en fazla duyarlılığa sahip antimikrobiyal ajanlar olarak tespit edilmişlerdir. Sonuç olarak çalışmaya alınan *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*

suşlarının imipenem direnci istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0,360$), meropenem direnci istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları tablo 7’de, *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 7. *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Dirençli (%)	Az dirençli (%)	Duyarlı (%)
Amikacin	48 (%96)	0 (%0)	2 (%4)
Aztreonam	50 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
Cefapime	43 (%86)	7 (%14)	0 (%0)
Ceftazidime	50 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
Ciprofloxacın	50 (%100)	0 (%0)	0 (% 0)
Gentamicin	50 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
İmipenem	50 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
Levofloxacın	49 (%98)	0 (%0)	1 (%2)
Meropenem	45 (%90)	5 (% 0)	0 (%0)
Piperacilin tazobactam	50 (%100)	0 (%0)	0 (%0)

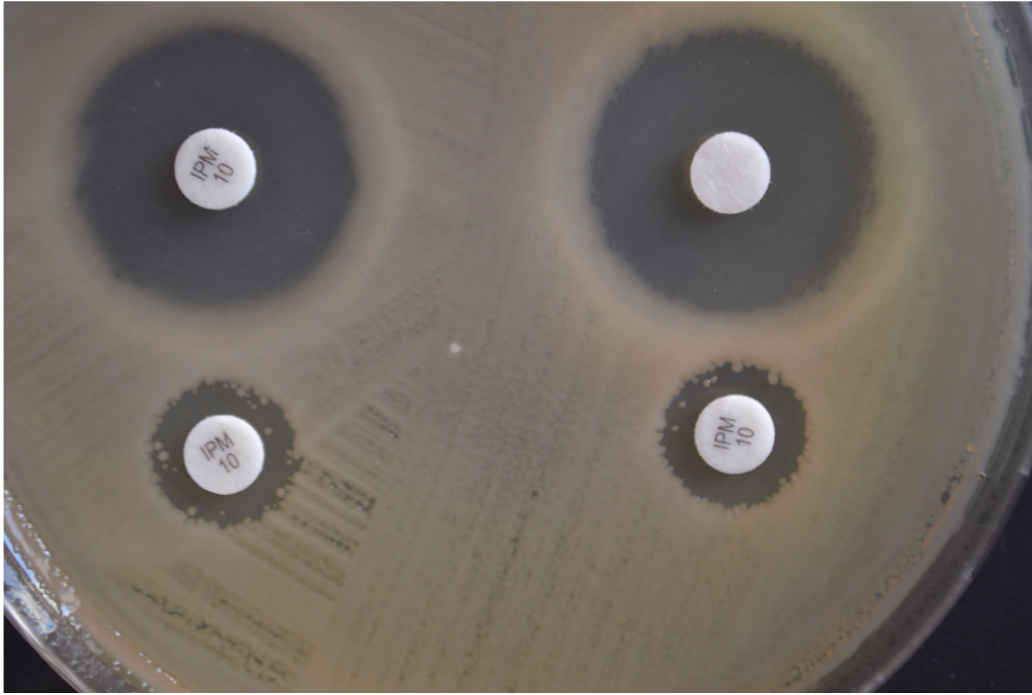
Tablo 8. *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Dirençli (%)	Az dirençli (%)	Duyarlı (%)
Amikacin	21 (%42)	18 (%36)	11 (%22)
Aztreonam	45 (%90)	3 (%6)	2 (%4)
Cefapime	44 (%88)	3 (%6)	3 (%6)
Ceftazidime	39 (%78)	0 (%0)	11 (%22)
Ciprofloxacın	33 (%66)	8 (%16)	9 (%18)
Gentamicin	44 (%88)	0 (%0)	6 (%12)
İmipenem	48 (%96)	1 (%2)	1 (%2)
Levofloxacın	40 (%80)	4 (%8)	6 (%12)
Meropenem	27 (%54)	21 (%42)	2 (%4)
Piperacilin	22 (%44)	0 (%0)	28 (%56)
Tazobactam			

Klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında MBL enziminin varlığını araştırmak için uygulanan fenotipik tesbit yöntemlerinden kombine disk sinerji testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testlerinin en az bir tanesi tüm suşlarda pozitif bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarında modifiye Hodge (%92) ve kombine disk sinerji testi (%90) daha fazla pozitif bulunurken, *P. aeruginosa* suşlarında çift disk sinerji testi (%80) ve kombine disk sinerji testi (%92) daha fazla pozitif bulunmuştur. Yapılan istatistik analiz sonucunda *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için MHT ($p < 0,001$) ve ÇDT ($p < 0,002$) anlamlı bulunurken, KDT istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0,727$). Sonuçları tablo 9 ve resim 1, 2, 3 ve 4’de gösterilmiştir.

Tablo 9. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında fenotipik test sonuçları
MHT: Modifiye Hodge testi, KDT: Kombine disk sinerji testi, ÇDT: Çift disk sinerji testi

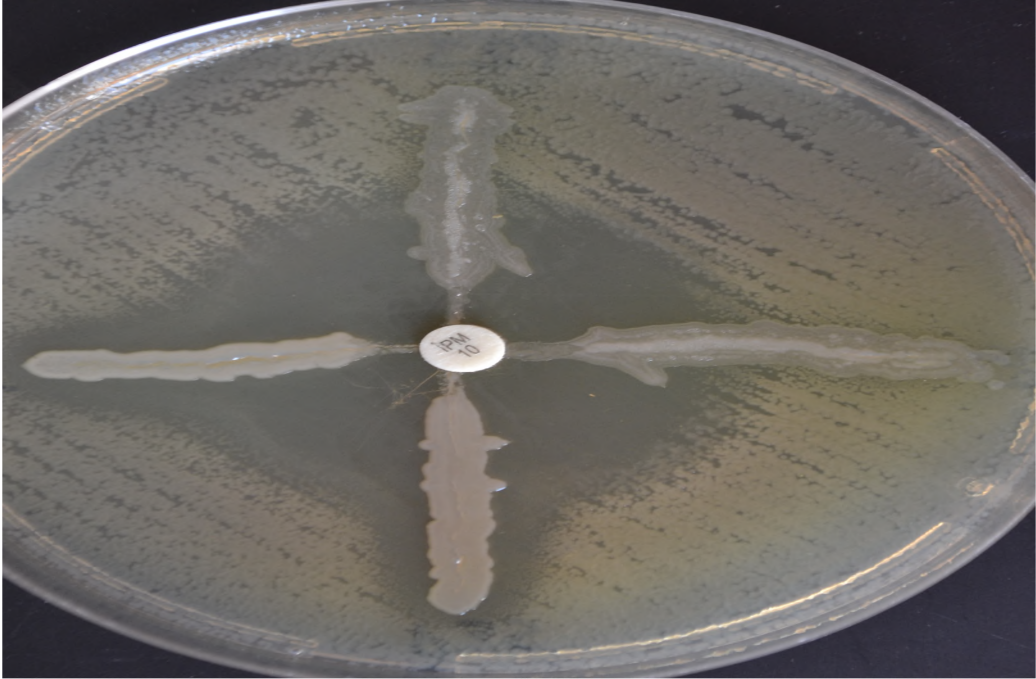
	MHT Pozitif n (%)	MHT Negatif n (%)	KDT Pozitif n (%)	KDT Negatif n (%)	ÇDT Pozitif n (%)	ÇDT Negatif n (%)
<i>A.baumannii</i>	46 (%92)	4 (%8)	45 (%90)	5 (%10)	25 (%50)	25 (%50)
<i>P.aeruginosa</i>	27 (%54)	23 (%46)	46 (%92)	4 (%8)	40 (%80)	10 (%20)



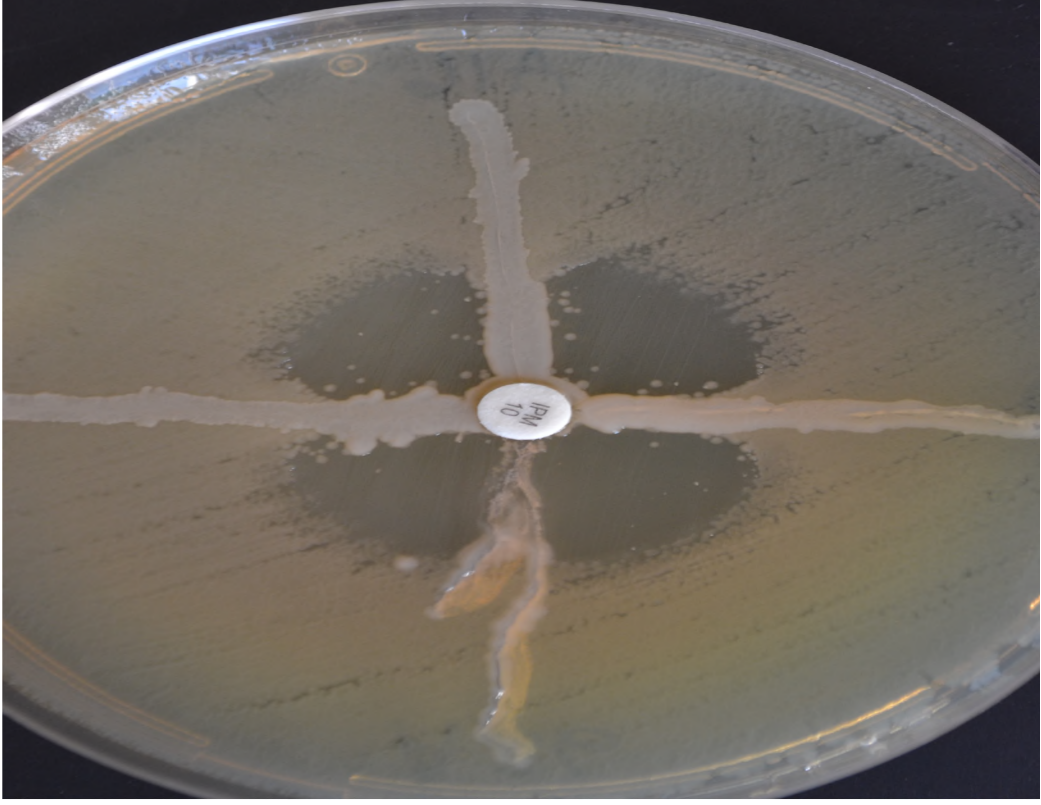
Resim 1. Negatif kombine disk sinerji testi ve negatif çift disk testi.



Resim 2. Pozitif çift disk sinerji testi ve pozitif kombine disk testi



Resim 3. Negatif modifiye hodge testi



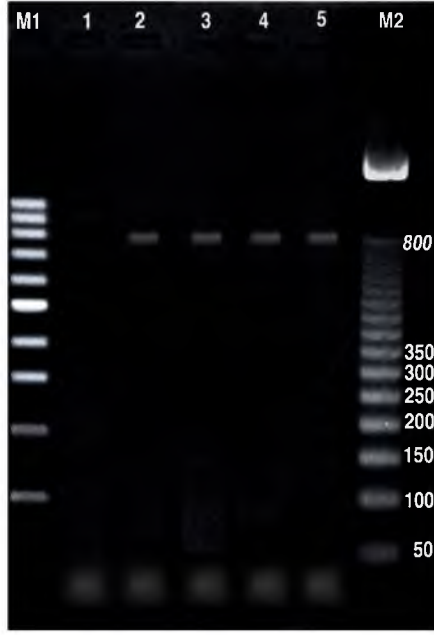
Resim 4. Pozitif modifiye hodge testi

A. baumannii ve *P. aeruginosa* suşlarında bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} , bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{KPC} , bla_{IMP} ve bla_{VIM} direnç genlerinin olup olmadığını araştırmak için yaptığımız PCR sonuçlarına göre; *A. baumannii* izolatlarının %98'inde bla_{OXA-51} geni, %14'ünde bla_{OXA-58} geni, %14'ünde bla_{OXA-23} geni ve %8'inde bla_{KPC} geni pozitif bulunurken, *P. aeruginosa* izolatlarının direnç geni bulunamamıştır. *A. baumannii* izolatlarında, OXA 58, OXA 23 ve KPC pozitif suşların tümünde aynı zamanda OXA-51'de pozitifdir ve bu izolatlarının tümünde OXA-24, VIM ve IMP enzimleri için kodlayan genler negatif bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarında tespit edilen, OXA-51 ($p < 0,001$), OXA-58 ($p < 0,006$), KPC ($p < 0,041$) istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, OXA-23 ($p > 0,766$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için PCR sonuçları

Tablo 10'da, KPC, OXA-23, 51 ve 58 için agaroz jel görüntüleri resim 5, 6, 7, 8'de gösterilmiştir.

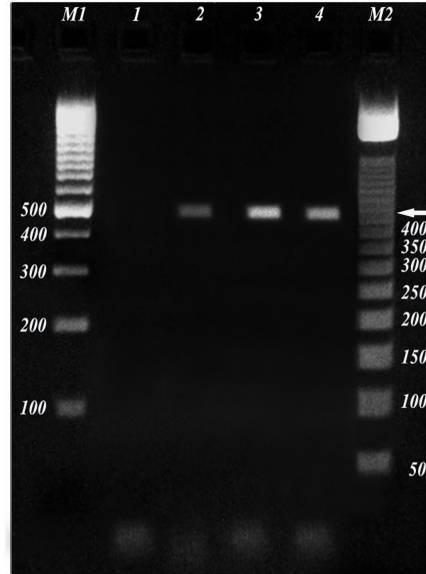
Tablo 10. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında PCR sonuçları

	<i>A.baumannii</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)
OXA-51	49 (%98)	1 (%2)	0 (%0)	50 (%100)
OXA-58	7 (%14)	43 (%86)	0 (%0)	50 (%100)
OXA-23	7 (%14)	43 (%86)	0 (%0)	50 (%100)
OXA-24	0 (%0)	50 (%100)	0 (%0)	50 (%100)
KPC	4 (%8)	46 (%92)	0 (%0)	50 (%100)
VIM	0 (%0)	50 (%100)	0 (%0)	50 (%100)
IMP	0 (%0)	50 (%100)	0 (%0)	50 (%100)



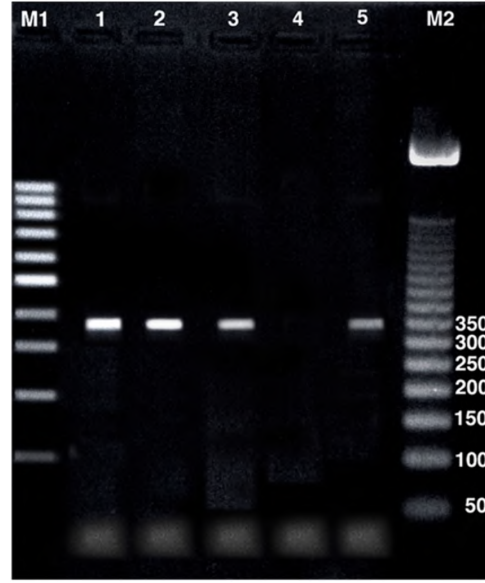
Resim 5. KPC genlerinde jel görüntüsü (785 bp):

M1: 100 bp DNA markeri (Geneon), M2: 50 bp DNA markeri (geneon), hat 1: negatif kontrol (steril dH2O), hat 2, 3, 4, 5: pozitif örnekler



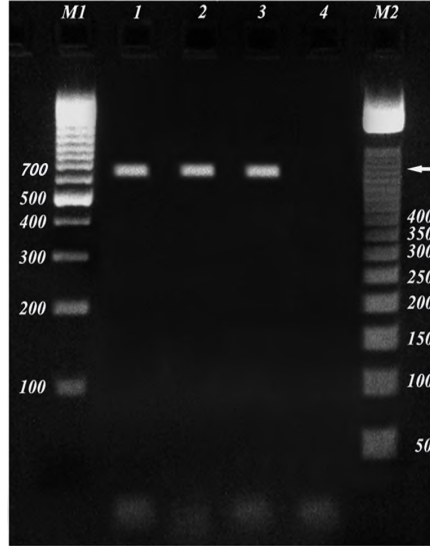
Resim 6. OXA-23 genlerinde jel görüntüsü (501 bp):

M1: 100 bp DNA markeri (Fermantes), M2: 50 bp DNA markeri (Fermantes), hat 1: negatif kontrol (steril dH2O), hat 2, 3, 4: pozitif örnekler



Resim 7. OXA-51 genlerinde jel görüntüsü (353 bp):

M1: 100 bp DNA markeri (Geneon), M2: 50 bp DNA markeri (geneon), hat 4: negatif kontrol (steril dH₂O), hat 1, 2, 3, 5: pozitif örnekler



Resim 8. OXA-58 genlerinde jel görüntüsü (691 bp):

M1: 100 bp DNA markeri (Fermantes), M2: 50 bp DNA markeri (Fermantes), hat 4: negatif kontrol (steril dH₂O), hat 1, 2, 3: pozitif örnekler

Agaroz jelde amplifikasyon büyüklüğüne göre, PCR şüpheli olarak belirlenen ve tesadüfi olarak seçilen 20 PCR ürününe ait *bla_{OXA}* gen bölgelerinin BLAST programında diğer gen dizilimleri ile alignmenti sonucu tüm örneklerin *A. baumannii* olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen dizilimlerin gen bankasındaki dizilimler ile BLAST programında belirlenen benzerliği OXA-23 primerleri ile çalışılan 5 örnekte %97-99, OXA-51 primerleri ile çalışılan 8 örnekte %95-98 ve OXA-58 primerleri ile çalışılan 7 örnekte ise %99-100 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre her üç OXA bölgesinde yüksek oranda korunduğu ancak, en korunmuş bölgenin OXA-58'e ait bölge olduğu kaydedilmiştir. Burada üç farklı OXA bölgesine ait dizilimlerin gen bankasındaki dizilimler ile kıyaslanması ve bu üç örnekle (Şekil 2, 3 ve 4) daha sonra gerçekleştirilen filogenetik ağaç görüntüsü (Şekil 5, 6 ve 7) verilmiştir.

9 nolu örnek GATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAA 60
 |||
 gb|KP264125 GATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAA 403

9 nolu örnek AAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGC 120
 |||
 gb|KP264125 AAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGC 463

9 nolu örnek AGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGT 180
 |||
 gb|KP264125 AGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGT 523

9 nolu örnek AAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGT 240
 |||
 gb|KP264125 AAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGT 583

9 nolu örnek AGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTC-AGAGGTAGAGTTTGGTTTCCCAATTAGCACATAC 299
 |||
 gb|KP264125 AGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAGAGGTAGAGTTTGGTTTCCCAATTAGCACATAC 643

9 nolu örnek ACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAG-CTA-TGT-AAAAATATGCTTCTTTTAG-AGA 355
 |||
 gb|KP264125 ACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAATATGCTTCTTTTAGAAGA 703

9 nolu örnek GAGTAATGGCTAC-AAATTTTGGAAAAGACTGGTTGGGCCATGGAAATAAAACCACAAGT 414
 |||
 gb|KP264125 GAGTAATGGCTACAAAATTTTGGAAAAGACTGGTTGGGCCAATGGATATAAAACCACAAGT 763

9 nolu örnek GGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCAGCCAGATGGAAAAATTGTCGCTGTTGCATTAAA 474
 |||
 gb|KP264125 GGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCAGCCAGATGGAAAAATTGTCGCTGTTGCATTAAA 823

9 nolu örnek TATGGAAATGCGGTCAGAAAT 495
 |||
 gb|KP264125 TATGGAAATGCGGTCAGAAAT 844

Şekil 2. OXA-23 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe (9 nolu örnek) ait dizilimin gen bankasında mevcut *A. baumannii* genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları (493/501, %98 identik).

1 nolu örnek TAATG-TTTGATCGGCCTTGAGCACCCATAAAGGGAACC-CCACAGGAAAGTATTAAAG 58
 ||||| ||||||||||||||||||| | ||||| ||||| ||||| | ||||||| |||
 gb|KJ584924 TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACC--AT-AAGGCAACCACCACA-G-AAGTATTTAAG 309

1 nolu örnek TGGGGATGGT-AAAAAAGGTTATTCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGC 117
 ||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 gb|KJ584924 TGGG-ATGGTAAAAAAGGTTATTCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGC 368

1 nolu örnek CATGAAAGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCT 177
 ||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 gb|KJ584924 CATGAAAGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCT 428

1 nolu örnek CATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGA 237
 ||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 gb|KJ584924 CATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGA 488

1 nolu örnek TAATTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTA 297
 ||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 gb|KJ584924 TAATTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTA 548

1 nolu örnek CAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAAGTGCAATCCA 357
 ||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
 gb|KJ584924 CAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAA-GTGCAATCCA 607

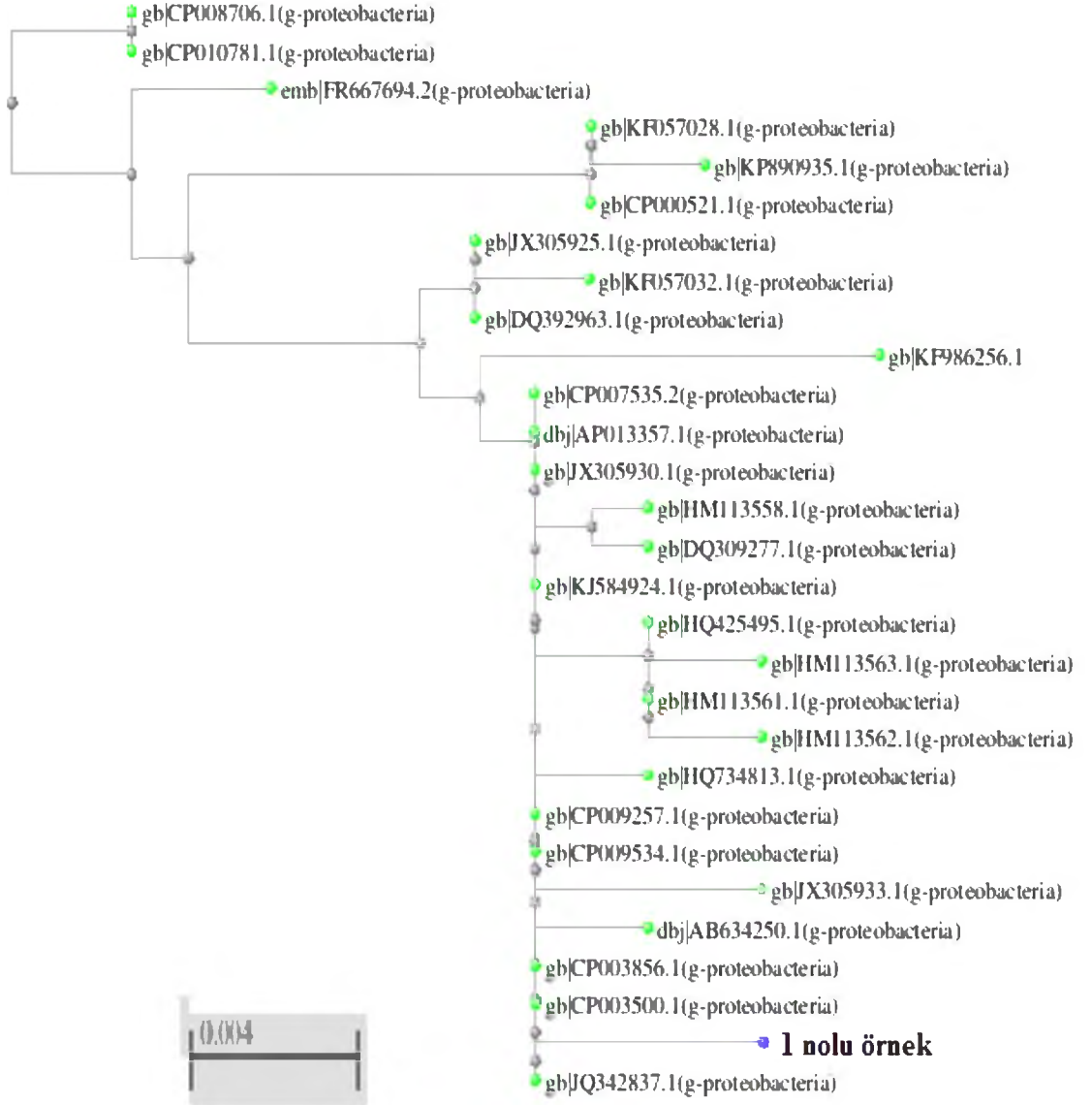
Şekil 3. OXA-51 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe (14 nolu örnek) ait dizilimin gen bankasında mevcut *A. baumannii* genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları (348/360, %97 identik).

14 nolu örnek	AAGTATTGGGGCTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCAAAAACAAGTACAATTCCACA	60
gb KE740446	AAGTATTGGGGCTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCAAAAACAAGTACAATTCCACA	65
14 nolu örnek	AGGTGAATAACTC-ATCATCGATCAGAATGTTCAAGCGCTTTTTAATGAAATCTCAGCTG	119
gb KE740446	AG-TGAATAACTCAATCATCGATCAGAATGTTCAAGCGCTTTTTAATGAAATCTCAGCTG	124
14 nolu örnek	ATGCTGTGTTTGTCCACATATGATGGTCAAAATATTAATAATGGCACGCATTAGACC	179
gb KE740446	ATGCTGTGTTTGTCCACATATGATGGTCAAAATATTAATAATGGCACGCATTAGACC	184
14 nolu örnek	GAGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAAATTGCCAATGCACCTAATTGGTT	239
gb KE740446	GAGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAAATTGCCAATGCACCTAATTGGTT	244
14 nolu örnek	TAGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCACGtTTTT	299
gb KE740446	TAGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCACGTTTTT	304
14 nolu örnek	ttAAAGCATGGGACAAAGATTTTACTTTGGGCGAAGCCATGCAAGCATCTACAGTGCCTG	359
gb KE740446	TTAAAGCATGGGACAAAGATTTTACTTTGGGCGAAGCCATGCAAGCATCTACAGTGCCTG	364
14 nolu örnek	TATATCAAGAATTGGCACGTCGATTTGGTCCAAGCTTAATGCAAAGTGAATTGCAACGTA	419
gb KE740446	TATATCAAGAATTGGCACGTCGATTTGGTCCAAGCTTAATGCAAAGTGAATTGCAACGTA	424
14 nolu örnek	TTGGTTATGGCAATATGCAAATAGGCACGGAAGTTGATCAATTTTGGTTGAAAGGGCCTT	479
gb KE740446	TTGGTTATGGCAATATGCAAATAGGCACGGAAGTTGATCAATTTTGGTTGAAAGGGCCTT	484
14 nolu örnek	TGACAATTACACCTATACAAGAAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCAAGGGCAATTGC	539
gb KE740446	TGACAATTACACCTATACAAGAAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCAAGGGCAATTGC	544
14 nolu örnek	CTTTTAAACCTGAAGTTCAGCAACAAGTAAAAGAGATGTTGTATGTAGAGCGCAGAGGGG	599
gb KE740446	CTTTTAAACCTGAAGTTCAGCAACAAGTAAAAGAGATGTTGTATGTAGAGCGCAGAGGGG	604

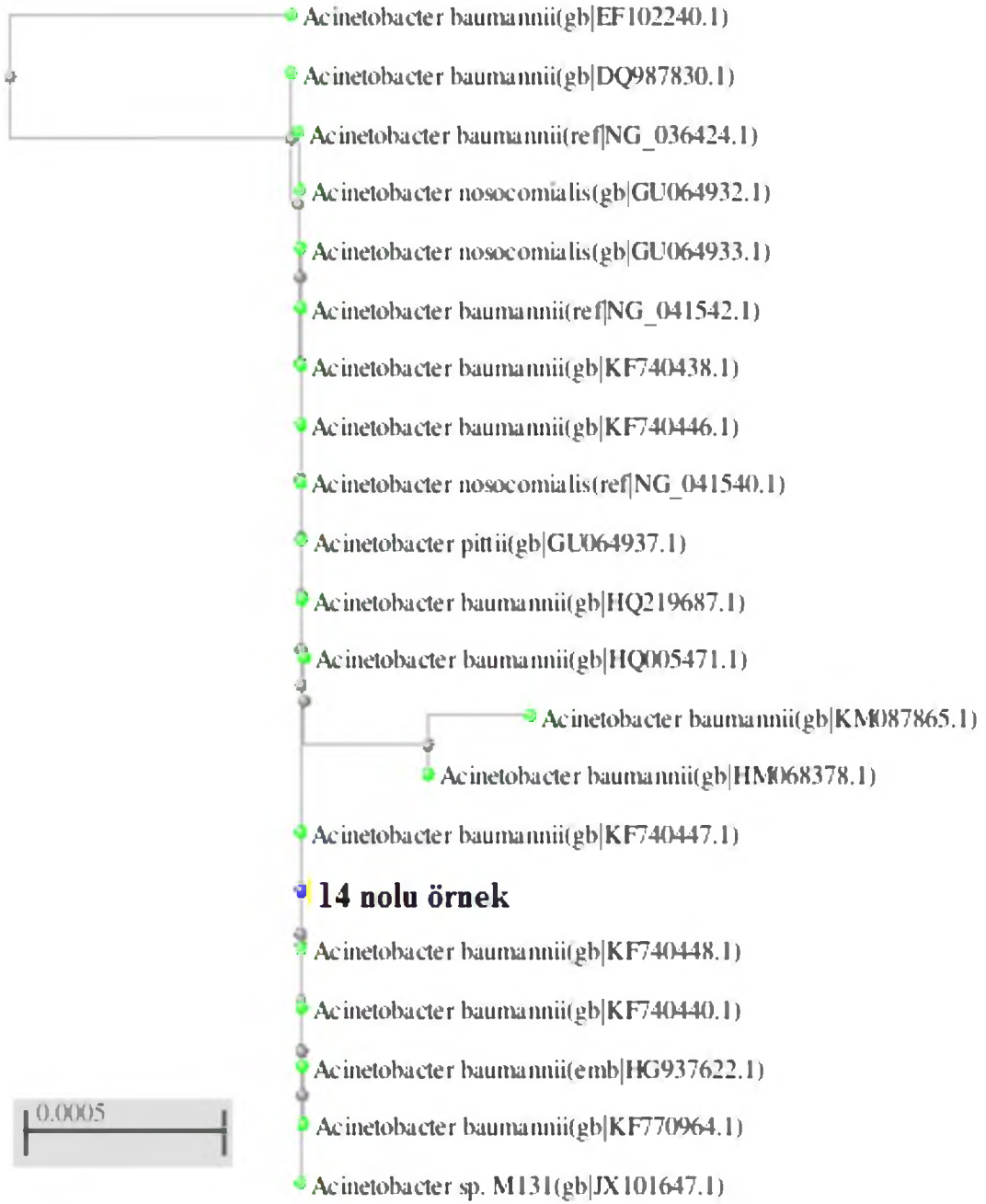
Şekil 4. OXA-58 primerleri ile PCR pozitif şüpheli klinik örneğe (14 nolu örnek) ait dizilimin gen bankasında mevcut *A. baumannii* genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları (600/602, %99 identik).



Şekil 5. OXA-23 primerleri ile çoğaltılan 9 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu (Gen bankasındaki bakterilerin gen bölgesi dizilimleri Sequens ID olarak verilmiştir).



Şekil 6. OXA-51 primerleri ile çoğaltılan 1 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu (Gen bankasındaki bakterilerin bölgesi dizilimleri Sequens ID olarak verilmiştir).



Şekil 7. OXA-58 primerleri ile çoğaltılan 14 nolu klinik örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu (Gen bankasındaki bakterilerin bölge dizilimleri Sequens ID olarak verilmiştir).

6. TARTIŞMA

Bakterilerde görülen direnç, enfeksiyonların tedavisinde, son yıllarda karşılaşılan en önemli sorundur. Dirençli bakteriler toplumda enfeksiyon kontrol önlemlerinde birçok sorun oluşturmalarına rağmen, hastanelerde ve yatan hastalarda daha fazla olumsuz etkiler oluşturmaktadırlar (12). Bunun nedeni hastanelerdeki kontrolsüz antibiyotik kullanımındaki artış ve ortamdaki bakteriyal kontaminasyondur (12, 31, 32, 45). Dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda, özellikle yoğun bakım hastalarının tedavileri için daha pahalı antibiyotiklerin kullanılması sebebiyle, maliyet artışı, hastanın hastanede yatış süresinin uzaması, morbidite ve mortalitede artışı gibi birçok sorunla karşılaşılmaktadır (32). Sonuç olarak dirençli bakteri türlerinin ve bu dirence sebep olan mekanizmaların sayılarındaki artış ve direnç tiplerinin farklı türler arasındaki aktarımı tedavi seçeneklerini gün geçtikçe azaltmaktadır (29).

A. baumannii ve *P. aeruginosa*, çoklu direnç kazanma özellikleri, dış ortama karşı dayanıklı olmaları ve salgınlara sebep olmaları nedeniyle, dirençli bakteriler içinde en sık izole edilen nonfermantatif Gram negatif bakterilerdir (1, 2, 12, 26, 46). Hastane enfeksiyonlarına sebep olan bu bakterilerdeki direnç mekanizmasının bilinmesi, bu enfeksiyonlar için uygun antibiyotik tedavisi ve bu enfeksiyonların kontrol altına alınması açısından oldukça önemlidir (7, 12, 24).

A. baumannii ve *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu hastane enfeksiyonlarında, tedavi için kullanılan en etkili antibiyotikler, beta laktam grubu antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahip olan karbapenemlerdir (6, 9, 10, 29). Tunçoğlu ve arkadaşları (52) yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa* izolatlarının, 2005- 2006, 2007- 2008 yılları arasında antibiyotik duyarlılıklarını

incelemiş ve en etkili antibiyotığın karbapenemler olduğunu bulmuşlardır. Klinikte kullanılan karbapenemler; imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenemdir (26, 28). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları imipenem ve meropenemdir. Bu karbapenemlerin antibiyotik duyarlılık sonuçları ve MİK değerleri; hem hastanın hayatı, hem de tedavinin başarısı açısından çok önemlidir (29, 44, 47). Bu sebeple bu duyarlılık sonuçları için ülkemizde kabul edilen standartlar CLSI standartlarıdır. Ancak bu standartlar tek başına yeterli olmadığı için yapılacak olan ek testler her açıdan daha doğru bir yaklaşım olacaktır (48, 49). İmipenem ve meropenemin duyarlılıkları birbirine paralel kabul edilmekte ve CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılık testlerinde birinin diğeri yerine kullanılabilceği önerilmektedir (44, 55).

Öğünç ve arkadaşları (46), 2010 yılında yaptıkları çalışmada; BD Phoenix tam otomatize identifikasyon sistemiyle *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında imipenem- meropenem duyarlılıklarını, disk difüzyon yöntemiyle karşılaştırmış ve %98.1 oranında uyumlu bulmuştur. Aynı şekilde yapılan bir başka çalışmada Donay ve arkadaşları (51), *P. aeruginosa* suşlarında, imipenem direncini disk difüzyon ve BD Phoenix tam otomatize identifikasyon sistemiyle karşılaştırmış ve % 100 uyumlu bulmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız, imipenem ve/veya meropenem dirençli yaklaşık 50 *P. aeruginosa*, 50 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya alınmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testleri için ticari olarak elde edilen imipenem (10µg) (Oxoid) diskleri kullanılmıştır. Bu duyarlılık test sonuçları aynı zamanda BD Phoenix tam otomatize identifikasyon sisteminin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmaya alınan örneklerin tümü disk diffüzyon

yönteminde, imipeneme dirençli bulunmuştur. BD Phoenix Tam Otomatize İdentifikasyon sistemi sonuçlarında da imipenem, her iki türde en yüksek dirence sahip olduğu için, iki yöntemin sonuçları uyumlu bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyumludur.

Karbapenemler; geniş spektruma sahip olmaları, bakteri dış memranından hızla geçebilmeleri gibi özelliklerinden dolayı çoklu direnç gösteren, Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında en fazla tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak günümüzde bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç tedavide önemli bir sorundur. Direnç mekanizmaları, ilacın hücrede yeterli konsantrasyona ulaşmaması ve karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzimlerinin varlığında gelişir (9, 11, 30). Karbapenemazlar; intrinsik, kromozomal karbapenemazlar ve kazanılmış karbapenemazlar olmak üzere iki gruptan oluşurlar (10, 11, 29, 30). Karbapenemazların bakteri direncindeki önemli rollerinden dolayı, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmeleri için çeşitli fenotip testlerinin uygulanması epidemiyolojik açıdan önemlidir (25, 29). MHT bunlardan biridir, CLSI klavuzuna göre %95-100 duyarlıdır ve KPC tipi karbapenemaz aktivitesini tespit etmede kullanılır. MHT tek başına, KPC tipi karbapenemazı diğer karbapenemazlardan ayıramadığı için, MBL enzimleri, OXA enzimlerinin tespitinde de kullanılabilir ancak bu testin özgüllüğünün düşük olmasına neden olur. (25, 30, 53, 54). Fenotipik testlerden diğerleri ÇDT ve KDT' dir. Özellikle B sınıfı MBL enzimlerinin tespit edilmesinde kullanılan bu testler birçok çalışmada önerilmiştir.

Demirdağ ve arkadaşları (56) yaptıkları bir çalışmada, enfeksiyon etkeni ve çoğul dirençli 43 *Pseudomonas spp.* suşunda MBL üretimini MHT ve ÇDT

yöntemi ile karşılaştırmıştır. MHT %37, ÇDT %79 olarak bulunmuş, ÇDT'nin MHT'e göre daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Köseoğlu Eser ve arkadaşları (57) yaptıkları çalışmada, 124 adet *A. baumannii* suşunda, mikrodilisyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarına bakmış, imipenem direncini %65.3 bulmuşlardır. Şuşlarda MBL tayini için yaptıkları KDT pozitifliğini %51.6 bulmuşlardır. KDT pozitif bulunan 64 izolatta *bla_{IMP-1}* ve *bla_{VIM-2}* genleri PCR ile araştırılmış ve negatif bulunmuştur. Sarı (44) uzmanlık tez çalışmasında, karbapenem dirençli, 25 *Pseudomonas spp.*, 57 pseudomonas dışı ve nonfermantatif gram negatif bakteri suşunda, MHT ve KDT ile MBL varlığını araştırmıştır. Çalışmasında *Pseudomonas spp.* suşlarında, MHT %12, KDT ise %52, 45 nonfermantatif gram negatif bakteri izolatında ise MHT %89, KDT %96 bulmuş, EDTA- KDT'nin MHT'e göre daha duyarlı olduğu sonucuna varmıştır. Sesli-Çetin ve arkadaşları (58), disk difüzyon yöntemiyle imipenem dirençli, 61 *A. baumannii*, 52 *P. aeruginosa* suşunda, MBL varlığını araştırmak için MHT, KDT ve ÇDT yapmışlardır. Sonuçlar; *A. baumannii* için, MHT %74, KDT %75, ÇDT %84, *P. aeruginosa* için, MHT %58, KDT %62, ÇDT %73 olarak bulunmuştur. Türk Dağı ve arkadaşları (59), karbapenem dirençli 202 *A. baumannii* suşunda, MBL varlığını KDT yöntemiyle araştırmışlar ve %69 oranında pozitif bulmuşlardır. Pozitif bulunan bu suşlarda, *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* genleri PCR yöntemi ile bakılmış ve tespit edilememiştir.

Çalışmamızda, CLSI kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testleri yapılan ve imipenem dirençli bulunan, 50 *A. baumannii*, 50 *P. aeruginosa* suşunun tümüne MHT, KDT ve ÇDT uygulanmıştır. *A. baumannii* suşlarında; MHT %92, KDT %90 ve ÇDT %50, *P.*

aeruginosa suşlarında; MHT %54, KDT %92 ve ÇDT %80 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; *A. baumannii* için karbapenemazların tespitinde, MHT ve KDT duyarlı bulunurken, *P. aeruginosa* için KDT ve ÇDT duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyumludur.

Fenotipik testlerde, CLSI tarafından önerilen standart bir yöntemin olmaması, karbapenemlerdeki düşük MİK değerleri, EDTA duyarlılığının standardize edilmemiş olması testleri yorumlamada güçlükler neden olmaktadır. (44, 60,61, 62). Ayrıca bu testlerin ticari olarak hazır elde edilememesi ve sonuçların bir gün sonra alınması nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerindeki ciddi enfeksiyonlarda, karbapenemazların hızlı ve doğru tespit edilmesi hastanın yaşamı için çok önemlidir. Fenotipik testlere göre daha duyarlı oldukları için, karbapenemazların tespitinde, bu testlerin yanında moleküler testlerde yapılmalıdır (25, 29).

Gökmen ve arkadaşları (63), yanık ünitesinde *A. baumannii* salgınına araştırmak üzere, üniteden aldıkları ve izole ettikleri 11 çevresel *A. baumannii* suşunda fenotipik olarak tanı koyduktan sonra, tip spesifik multiplex PCR yöntemi ile *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-24}* geni bakmışlardır. Tüm izolatlarda pozitif buldukları *bla_{OXA-51}* genine ilaveten 3 suşta aynı zamanda *bla_{OXA-24}* geni bulmuşlardır. Bu izolatlardaki klonal ilişkinin tespiti için yaptıkları PFGE sonucuna görede suşların tümünün bir ana küme içinde, yakın ilişkili 2 alt kümede toplandıklarını tespit etmişlerdir. Keskin ve arkadaşları (64), yaptıkları çalışmada, 201 *A. baumannii* suşunda PCR yöntemiyle *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-24}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* direnç genlerine bakmışlar; *bla_{OXA-51}* pozitifliği %100, *bla_{OXA-23}* %91.5, *bla_{OXA-58}* %3.5, *bla_{OXA-24}* %1 bulunurken diğer

direnç genlerini tespit edememişlerdir. Suşların moleküler tiplendirmelerini PFGE yöntemiyle yapıp, izolatları 4 farklı genotip altında sıralamışlardır, izolatların birbirine benzerliklerinin %70'in altında bulunduğunu ve baskın bir izolatın olmadığını bulmuşlardır. Tek başına *bla*_{OXA-51} pozitif 12 suşun fenotipik olarak imipenem direncinin olmadığını tespit etmiş, imipenem dirençli izolatlarda *bla*_{OXA-51}'in yanında mutlaka başka bir veya birkaç oksasilinaz direnç geninin pozitif olduğu belirtmişlerdir. Woodford ve arkadaşları (65) yaptıkları çalışmada, *A. baumannii* suşlarında *bla*_{OXA-51} geninin karbapenem direnci ile ilişkili olmadığını, bu gene yerleşmiş ISAbal segmentinin karbapenem direnci ile ilişkili olduğunu, ancak OXA-23, 24 ve 58'in karbapenem direnciyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Mendes ve arkadaşları (66), 10 ülkeden, 41 hastane kökenli, 230 *A. baumannii* suşunun, %70.4'ünde imipenem veya meropenem direnci, %70 sınıf D karbapenemaz ve %0.8 MBL tespit etmişlerdir. *bla*_{OXA-23} geni 6 ülkede yaygınken, *bla*_{OXA-58} ve *bla*_{OXA-23}'ün daha az yaygın olduğunu bulmuşlardır. Gür ve arkadaşları (67) benzer bir çalışmada, İstanbul ve Ankara şehirlerindeki hastane kökenli *A. baumannii* suşlarında, PCR yöntemiyle baktıkları *bla*_{OXA-58} gen pozitif suşların PFGE yöntemiyle yaptıkları moleküler tiplendirmesinde; iki şehirdeki pozitif suşların klonal dağılımının birbirinden farklı, aynı şehirdeki suşların ise benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Buldukları *bla*_{OXA-23} gen pozitif suşların ise klonal ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Karbapenem hidrolizine neden olan beta laktamazlardan OXA enzimleri, OXA-51, 58, 23, 24 olmak üzere 4 ana gruptan oluşur. OXA-51 doğal, diğerleri kazanılmış beta laktamazlardır. OXA-51 ve 24 kromozomal, OXA-23 ve 58 plazmid kökenlidir (68). *A. baumannii*'de karbapenem direnci en sık beta

laktamazlarla gelişmektedir. Giderek artan sayıdaki direnç oranlarına ilaveten dirençli bakterilerin tedavisinde son seçenek olarak kullanılan kolistin ve polimiksin B içinde direnç bildirimlerinde artış vardır (70). OXA-51 *A. baumannii* suşlarında intrinsik olarak bulunur ve bu gen üzerine yerleşmiş olan ISAba1, karbapenem direnciyle ilgilidir (70). Yaptığımız PCR sonuçlarına göre; *A. baumannii* suşlarında, OXA-51 %98, OXA-58 %14, OXA-23 %14 pozitif bulunurken, OXA-24 enzimleri için kodlayan gen tespit edilememiştir. *P. aeruginosa* suşunda ise bu gen bölgelerinin hiç biri bulunamamıştır. Sonuçlar daha önceki yurt içi ve yurt dışı çalışmalarla uyumludur. Günümüzde genotiplendirmede, halen altın standart olarak kabul edilen yöntem sekans analizidir. Çalışmamızda bu amaçla, PCR yöntemiyle, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} ve *bla*_{OXA-23} genleri pozitif bulunan *A. baumannii* suşlarından, gelişigüzel seçilen 20 örneğe sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonucuna göre, bu gen bölgelerinin BLAST programında diğer gen dizilimleri ile alignmentı sonucu tüm örneklerin *A. baumannii* olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen dizilimlerin gen bankasındaki dizilimler ile BLAST programında belirlenen benzerliği OXA-23 primerleri ile çalışılan 5 örnekte %97-99, OXA-51 primerleri ile çalışılan 8 örnekte %95-98 ve OXA-58 primerleri ile çalışılan 7 örnekte ise %99-100 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre her üç OXA bölgesinde yüksek oranda korunduğu ancak, en korunmuş bölgenin OXA-58'e ait bölge olduğu kaydedilmiştir.

Robledo ve arkadaşları (76) içinde *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşunun bulunan 10.507 Gram negatif suşta PCR yöntemiyle *bla*_{KPC} geni bakmışlar; *P. aeruginosa* suşlarının 99 tanesinde, *A. baumannii* suşlarının 41 tanesinde *bla*_{KPC}

geni bulmuşlar, bu durumun *bla_{KPC}* geninin klinik olarak önemli nazokomiyal yayılımlara neden olacağını belirtmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Robledo ve arkadaşları Puerto Rico'da (77), Poirel ve arkadaşları İngiltere'de (78) *P. aeruginosa* suşlarında ve Akpala ve arkadaşları Trinidad ve Tobago'da (79) *A. baumannii* suşlarında *bla_{KPC}* geni tespit etmişlerdir. Villages ve arkadaşlarının (80) yaptıkları çalışmada, Kolombiya'da dirençli üç *P. aeruginosa* suşunda tespit ettikleri KPC enzimi, *bla_{KPC}* geninin *Enterobacteriaceae* ailesi dışında görülmesini rapor eden ilk çalışmadır. Sacha ve arkadaşları (82), *bla_{KPC}* genlerinin hızlı yayılımlarını, hareketli olmalarına ve plazmid veya transpozonlar üzerinde bulunmalarına yormuşlardır. Bu plazmidler aynı zamanda aminoglikozid direnci göstergesi ve diğer antibiyotik genleriyle ilişkili olduğunu söylemişlerdir.

Çalışmamızda yaptığımız PCR sonuçlarına göre 50 *A. baumannii* suşunda, 4 *bla_{KPC}* geni pozitif bulunmuştur, 50 *P. aeruginosa* suşunda ise hiç pozitif bulunamamıştır. Bu oranlar yapılan benzer çalışmalarla uyumludur. Pozitif bulunan genlerin PCR ürünleri yetersiz olduğu için sekans analizleri yapılamamıştır.

Er ve arkadaşları (84), yatan hastalardan izole ettikleri 195 *P. aeruginosa* suşunda, real-time PCR yöntemiyle direnç genlerine bakmışlar; dört izolatta VIM, 2 izolatta IMP bulmuşlar, *bla_{KPC}* genine rastlamamışlardır. *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* genlerinin tespit edildiği suşlarda imipenemin dirençli olduğunu ve fenotipik olarak MBL ürettiğini saptamışlardır. Ayrıca dizi analizi sonuçlarına göre *bla_{VIM}* geni saptanan izolatların hepsinin VIM-2, IMP izolatlarının hepsinde IMP-1 olduğunu tanımlamışlardır. Wolter ve arkadaşları (85), yaptıkları çalışmada; 6 aylık süre zarfında 513 *P. aeruginosa* suşu, 13 PFGE grubuna ayırmışlar ve bu

gruplardaki 37 suşu karbapenem dirençli bulmuşlardır. 4 PFGE grubundan alınan 37 suşun 7 tanesi *bla_{KPC}*, 7 PFGE grubundan alınan 37 suşun 25 tanesinde ise *bla_{IMP-18}* bulmuşlardır. Bu sonuçlarına göre buldukları *bla_{KPC}* pozitif *P. aeruginosa* suşularının, çeşitli Puerto Rico hastanelerinde yayılımlarına, *bla_{IMP-18}* ve *bla_{KPC}*'nin genetik olarak bağımsız suşlarla yayılımlarına işaret ettiğini belirtmişlerdir. Çekin ve arkadaşları (86), bir hatane salgınında, 4 aylık süre boyunca topladıkları karbapenem dirençli 26 *P. aeruginosa* suşunda yaptıkları PFGE sonucunda, suşların 4 küme içinde dağılım gösterdiğini ve suşların 4 ayrı klondan kaynaklandığını söylemişlerdir. Ulusoy Al ve arkadaşları (87), yaptıkları çalışmada, imipenem dirençli 79 *A. baumannii* suşunda PZR yöntemiyle *bla_{IMP}* araştırmış ancak bu direnç genine rastlamamışlardır. Daha sonra, suşları PFGE yöntemiyle tiplendirmişler, suşların 10 farklı gruba ayrıldığını, özellikle iki grupta yoğunlaşma olduğunu, fenotipik testleri pozitif olan suşlarda gruplaşmanın daha fazla olduğunu söylemişlerdir.

Metallo beta laktamazlar içinde bulunan IMP ve VIM esas olarak *P. aeruginosa*'da tespit edilir, fakat bu grup beta laktamazları *Enterobacteriaceae*'lardada gösteren dünya genelinde raporlar bulunmaktadır (10). Metallo beta laktamazlar kromozomal veya plazmid kökenlidir, özellikle plazmid kökenli olanlar integronlar içinde gen kasetleri şeklinde bulunurlar. Bu MBL genler plazmid veya transpozonlar aracılığıyla mikroorganizmalar arasında hareket ettikleri için dünya çapında hızlı bir şekilde yayılım göstermektedir (88). Poirel ve arkadaşları (89), yaptıkları çalışmada, multipleks PCR yöntemiyle 11 ayrı direnç geni bakmışlardır. *bla_{VIM-2}* direnç genini *P. aeruginosa* suşlarında, *bla_{IMP-1}* direnç genini ise *K. Pneumoniae* suşlarında tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda PCR sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* suşlarında ve *A. baumannii* suşunda, *bla_{IMP}* ve *bla_{VTM}* genleri bulunamamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamız bu bölgede çok yapılan bir çalışma olmadığı için epidemiyolojik öneme sahiptir. Karbapenem direncine sahip beta laktamaz genlerini taşıyan kökenlerin saptanması ve beta laktamazların tiplendirilmesinin; özellikle tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve enfeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 243-255.
2. Vahaboğlu H, Akhan S. *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 2175-2186.
3. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 2195-2201.
4. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* ve diğer Nonfermentatif gram negatif basiller. Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Zarakolu P. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 770-774.
5. Hill EB, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Şener B. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 734-743.
6. Şenol E. Karbapenemler ve monobaktamlar. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 288-293.
7. Rice LB, Bonomo RA. Antibakteriyel ilaçlara Direnç Mekanizmaları. Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical

- Microbiology. Gür D. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 1114-1136.
8. Gülay Z. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 227-243.
9. Bush K. Bench to bedside review: The role of beta lactamases in antibiotic resistant gram negative infections. The Critical care forum 2010; 14 (3): 224.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile beta-Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 2007; 20 (3): 440-458.
11. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 210-229.
12. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 1997; 1: 38-45.
13. Topçu Albayrak G. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *P. aeruginosa* Kökenlerinde Çift Disk Sinerji Testi ve Kombine Çift Disk Sinerji ile Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008.
14. Weinstein RA: Nosocomial infection update. Emerg Infect Dis 1998; 4: 416-420.
15. Gördebil S. Karbapenem Dirençli *A. baumannii* İzolatlarında Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Genotip Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.

16. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Diagnostic Microbiology. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 1990; 148-386.
17. Çelik N. Çoğul Dirençli Nozokomiyal *P. aeruginosa* suşlarında Beta Laktamazların Fenotipik ve Genotipik Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
18. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. The New England Journal Medicine, 2008; 358 (12): 1271-1281.
19. Özbey N. Karbapenemlere Dirençli *A. baumannii* İzolatlarında Moleküler Tiplendirme ve Karbapenemazların Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çanakkale: Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.
20. Jawad A, Hawkey P, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.* and comparison with Herellea agar and Holton's agar. Journal Clinical Microbiology, 1994; 32 (10): 2353-2358.
21. Yao JDC, Moellering RC. Antibakteriyel ajanlar. İn: Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Köksal İ. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 1077-1137.
22. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Derg 2003; 17 (3): 192-204.
23. 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.

24. Eraksoy H. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics 2011; 4 (1): 1-14.
25. Aktaş Z. Direnç mekanizmaları ve direnç belirleme yöntemleri. ANKEM Derg 2012; 26 (Ek 2): 278-282.
26. Hamouda A, Findlay J, Amyes SGB. Carbapenems: do they have a future? Journal of Medical Microbiology 2011; 60:1229-1230.
27. Şenol E. Karbapenemlerin yeni açılımları. ANKEM Derg 2009; 23 (Ek 2): 14-16.
28. Mülazımoğlu L. 1986'dan günümüze karbapenemler. ANKEM Derg 2010; 24 (Ek 2): 33-35.
29. Budak S, Aktaş Z, Erdem H. Enterik gram-negatif bakterilerde laboratuvarından kliniğe karbapenemazlar J Infect Microb Antimicrob 2012; 1: 1-11.
30. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Emerg Infect Dis 2011; 17 (10): 1791-1798.
31. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-Beta-Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18 (2): 306-325.
32. Somer A. Antibiyotiklerde direnç sorunu. Türk Ped Arş 2010; 45: 45-49.
33. Taşova Y. Gram negatif enterik bakteri infeksiyonlarının yönetimi. ANKEM Derg 2011; 25 (Ek 2): 34-44.
34. Hamaçça, Ö. *Enterobacteriaceae* Ailesi Üyelerinde OXA Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.

35. Torol S. *Acinetobacter baumannii* Kökenli Beta-Laktamaz OXA-23 Geninin Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
36. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008; 266-288.
37. 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.
38. Buynak JD, Chen H, Vogeti L, Gadhachanda VR, Buchanan CA, Palzkill T, et al. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine- β -lactamases. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14: 1299-1304.
39. Yan JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo Beta-lactamases in Gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 5-11.
40. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal Of Clinical Microbiology 2007; 45(2): 453-460.
41. Turton JF, Woodford N, Glover J et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. Journal Of Clinical Microbiology 2007; 44 (8): 2974- 2976.
42. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 2012; 67 (4): 906-909.

43. D'Andrea MM, Gianni T, D' Arezzo S et al. Characterization of pABVA01 plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (8): 3528-3533.
44. Sarı H. Karbapenemlere dirençli gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenem-ETDA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo- beta-laktamaz (MBL) varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul: Sağlık bakanlığı Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve araştırma hastanesi.
45. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 2006; 119: 3-10.
46. Ögünç D, Öngüt G, Özen NS ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında BD Phoenix sistemi ile saptanan karbapenem direncini raporlayalım mı? . *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 197-202.
47. Potz NA, Mushtaq S, Johnson AP, et al: Reliability of routine disc susceptibility testing by the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) method. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 729-738.
48. Ferraro MJ: Should we re-evaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis* 2001; 33: 227- 229.
49. Arıkan Akan Ö, Uysal S. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenem duyarlılığında disk difüzyon testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39: 273-279.
50. Alpat SN, Aybey AD, Akşit F ve ark. *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarının tigesiklin ve karbapeneme karşı in vitro duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 641-645.

51. Donay JL, Mathieu D, Fernandes P, et al. Evaluation of the automated Phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2004; 42: 1542-1546.
52. Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik rneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2009; 23 (2): 54-58.
53. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; update, CLSI document M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2010).
54. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. Clinical Microbiology Newsletter 2009; 31: 55-62.
55. Yüce A, Yapar N, Eren Kutsoylu O. İzmir Dokuz Eylül niversite Hastanesi yoğun bakım hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının 2000-2002 ve 2003-2006 yıllarında saptanan antibiyotik duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2009; 43: 195-202.
56. Demirdağ K, Cabalak M, zgler M. Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas spp.* suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz sıklığının araştırılması. ANKEM Derg 2011; 25 (3): 150-156.
57. Köseoğlu Eser , Ergin A, Haşelik G. Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve Metallo-Beta-Laktamaz varlığı. Mikrobiyol Bul 2009; 43: 383-390.

58. Sesli - Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Aridoğan B. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* (Turkish Journal of Infection) 2009; 23 (2): 51-55.
59. Türk Dağı H, Kuş H, Keyik Ş ve ark. Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz varlığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2012; 26 (4): 187-192.
60. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 131-143.
61. Aktas Z, Bal Kayacan, Ç. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008; 40: 320-325.
62. Samuelsen O, Buarq L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 827-830.
63. Gökmen T, Güran M, Benk G, Kızılyıldırım S, Köksal F. Yanık ünitesinde kısa-dönem/uzun-dönem *Acinetobacter baumannii* salgını. *ANKEM Derg* 2012; 26 (3): 120-125.
64. Keskin H, Tekeli A, Dolapçı İ, Öcal D. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında Beta-laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48 (3): 365-376.
65. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *J Antimicrobial*

Agents 2006; 27: 351-353.

66. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter spp.* in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 55-59.

67. Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 1529-1532.

68. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006; 12 (9): 826-836.

69. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 2010; 65: 233-238.

70. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2007; 60 (5): 1163-1167.

71. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM: Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1996, 40: 509-513.

72. Hawkey PM: Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (1):159-165.

73. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM: Prevalence of extended- spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (1):154-158.
74. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-151.
75. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ: Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Ch.* 2010; 54: 1354-1357.
76. Robledo IE, Aquino EE, Va GJ. Detection of the KPC Gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-Based Nosocomial Surveillance Study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Ch.* 2011; 55 (6): 2968-2970.
77. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* In Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54 (3): 1354-1357.
78. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E. Emergence of KPC producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54 (7): 3072.
79. Akpala PE, Swanston WH, Ihemere HN. et al. Emergence of KPC producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47 (8): 2670-2671.
80. Villegas MV, Lolans K, Correa A. et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing Beta-

Lactamase. Antimicrob Agents Ch 2007; 51 (4): 1553-1555.

81. Naas T, Cuzon G, Villages MV. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta lactamase bla KPC gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52 (4): 1257-1263.

82. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J. et al. The KPC type beta lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenemes in gram negative bacilli. Folia Histochemica et Cytobiologica 2009; 47 (4): 537-543.

83. Ambler RP: The structure of β -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980, 289:321-331.

84. Er H, Altındış M, Aşık G, Demir C. Seftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında beta-laktamazların moleküler epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul 2015; 49 (2): 156-165.

85. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE. et al. Surveillance of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -Lactamases. Antimicrob Agents Ch 2009; 53 (4): 1660-1664.

86. Çekin Y, Karagöz A, Kızılateş F. ve ark. Karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı bir hastane enfeksiyonu salgınının incelenmesi. Mikrobiyol Bul 2013; 47 (4): 619-627.

87. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N. ve ark. İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2011; 41 (1): 29-36.

88. Kbasmacı , Midilli K, Issa G, Gven , Gnll N. VIM ve IMP tipi Metallo Beta Laktamaz genlerinin hızlı saptanması iin yeni bir multipleks PZR metodu Turkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30 (4): 1312-1316.

89. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2011; 70: 119-123.

8. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Muş'un Bulanık ilçesinde tamamladı. 1987 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 1992 yılında mezun oldu. 1995 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi'nde, Mikrobiyoloji Laboratuvarında Biyolog olarak göreve başladı. 1996 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AB dalında yüksek lisansa başladı, 1998 yılında yüksek lisansı tamamladı. 1999 yılında aynı bölümde doktora programına başladı ancak kişisel nedenlerden dolayı 2007 yılında programdan ayrıldı ve 2009 yılında Fırat Üniversitesi Mikrobiyoloji AB dalında doktora programına başladı, eğitimi halen devam etmektedir. Şu anda Bursa Gıda ve Yem Kontrol Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde, Mikrobiyoloji bölümünde çalışmaktadır.