



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Acinetobacter baumannii complex

**KLİNİK İZOLATLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Gülşen ULUÇAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Acinetobacter baumannii complex
**KLİNİK İZOLATLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Gülşen ULUÇAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

TRABZON-2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gülşen ULUÇAM' ın hazırladığı "*Acinetobacter baumannii* complex Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nuri KALYONCU

Doç. Dr. İlknur TOSUN

Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

Tarih: 25.10.2012


Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



25.06/2012

Gülşen ULUÇAM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sevgili tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU' na motive edici desteği ve hoşgörüsü için; bölüm başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN' a, bölüm hocalarım Prof. Dr. Murat ERTÜRK' e, Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA' ya emekleri ve özverileri için teşekkür ederim. Trabzon' a geldiğim ilk günden itibaren desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. İlknur TOSUN' a; tez çalışmam boyunca her kapısını çaldığımda sabırla ve samimiyetle bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. C. Kurtuluş BURUK' a emeği ve desteği için teşekkürü borç bilirim.

DNA dizi analizi çalışmalarımnda bilgi ve teknik imkânlarını paylaşma nezaketinde bulunan Doç. Dr. Ersan KALAY' a, Arş. Gör. Orhan SEZGİN' e ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' na teşekkür ederim.

Destek, samimiyet ve yardımlarından dolayı anabilim dalımızda yüksek lisans, doktora, uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve Tıbbi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Trabzon' a adaptasyonum ve eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda hissettiğim değerli dostlarım Arş. Gör. Burcu YÜCEL' e ve Arş. Gör. Ahu KAMBUROĞLU' na; bilgi, tecrübe ve deneyimlerini paylaştığım; tavsiye ve fikirlerine saygı duyduğum sevgili kıdemlilerim Dr. Yeşim BEŞLİ' ye ve Arş. Gör. Nejla CEBECİ GÜLER' e tüm samimiyetimle teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini, sevgisini sürekli hissettiğim, hayatımın vazgeçilmez parçaları olan değerli anneme, babama, sevgili kardeşlerime, biricik anneanneme ve değerli dostlarıma tüm samimiyetimle teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Gülşen ULUÇAM

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| İç kapak sayfası | |
| KABUL ve ONAY | |
| BEYAN | |
| TEŞEKKÜR | |
| TABLolar DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ | x |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. SUMMARY | 3 |
| 3. GİRİŞ ve AMAÇ | 5 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 7 |
| 4.1 <i>Acinetobacter</i> spp. | 7 |
| 4.1.1 Tarihçe ve taksonomi | 7 |
| 4.1.2 Genel mikrobiyolojik özellikler | 9 |
| 4.1.3 Epidemiyoloji | 10 |
| 4.1.4 Virülans faktörleri | 11 |
| 4.1.5 <i>Acinetobacter</i> enfeksiyonlarının patogenezi | 11 |
| 4.1.6 <i>Acinetobacter</i> kökenleriyle oluşan hastane kaynaklı enfeksiyonlar | 12 |
| 4.1.6.1 Solunum yolu enfeksiyonları | 12 |
| 4.1.6.2 Bakteriyemi | 13 |
| 4.1.6.3 Menenjit | 14 |
| 4.1.6.4 İdrar yolu enfeksiyonu | 14 |
| 4.1.6.5 Yumuşak doku enfeksiyonları | 14 |
| 4.1.6.6 Diğer enfeksiyonlar | 14 |
| 4.2 <i>A. baumannii</i> complex enfeksiyonlarının tedavisi | 15 |
| 4.3 Antimikrobiyal direnç mekanizmaları | 16 |
| 4.3.1 Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları | 16 |
| 4.3.2 Beta laktamazlar | 17 |
| 4.3.2.1 Kromozomal beta laktamazlar | 19 |

| | |
|---|----|
| 4.3.2.2 Plazmid aracılığı ile sentezlenen beta laktamazlar | 20 |
| 4.3.3 Karbapenemleri hidrolize edebilen beta laktamazlar | 20 |
| 4.3.3.1 Sınıf A karbapenemazlar | 21 |
| 4.3.3.2 Sınıf B karbapenemazlar | 22 |
| 4.3.3.3 Sınıf D karbapenemazlar | 28 |
| 5.GEREÇ ve YÖNTEM | 32 |
| 5.1 Gereç | 32 |
| 5.1.1 Çalışma grubu | 32 |
| 5.1.2 Araç ve gereçler | 34 |
| 5.1.3 Kimyasallar | 35 |
| 5.1.4 Besiyerleri | 35 |
| 5.1.5 Solüsyonlar | 36 |
| 5.1.5.1 DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar | 36 |
| 5.1.5.2 Master mix için kullanılan solüsyonlar | 36 |
| 5.1.5.3 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan solüsyonlar | 37 |
| 5.2 Yöntem | 37 |
| 5.2.1 İzolatların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri | 37 |
| 5.2.2 Metallo beta laktamazların fenotipik olarak tanımlanması | 38 |
| 5.2.2.1 İmipenem/ imipenem-EDTA içeren kombine disk testi | 38 |
| 5.2.2.2 Modifiye Hodge test | 39 |
| 5.2.3 DNA izolasyonu | 40 |
| 5.2.4 Master mix hazırlanması | 40 |
| 5.2.5 Polimeraz zincir reaksiyonu | 41 |
| 5.2.5.1 Metallo beta laktamaz varlığını araştırmak için kullanılan primerler | 42 |
| 5.2.5.2 OXA varlığını araştırmak için kullanılan primerler | 42 |
| 5.2.6 PCR ile amplifikasyon | 43 |
| 5.2.6.1. <i>bla</i> _{IMP} geninin amplifikasyonu | 43 |
| 5.2.6.2 <i>bla</i> _{VIM} geninin amplifikasyonu | 43 |
| 5.2.6.3 <i>bla</i> _{IMP-1} ve <i>bla</i> _{IMP-2} genlerinin amplifikasyonu | 44 |
| 5.2.6.4 <i>bla</i> _{VIM-1} ve <i>bla</i> _{VIM-2} genlerinin amplifikasyonu | 44 |
| 5.2.6.5 <i>bla</i> _{SIM-1} , <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{GIM-1} genlerinin amplifikasyonu | 45 |
| 5.2.6.6 <i>bla</i> _{OXA 23-like} , <i>bla</i> _{OXA 24-like} , <i>bla</i> _{OXA 51-like} , <i>bla</i> _{OXA 58-like} genlerinin amplifikasyonu | 45 |

| | |
|--|----|
| 5.2.7 Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme | 46 |
| 5.2.8 DNA dizi analizi | 46 |
| 6. BULGULAR | 48 |
| 6.1 Araştırmaya dahil edilen izolatların genel özellikleri | 48 |
| 6.2 İzolatların antibiyotik duyarlılıkları | 49 |
| 6.3 Metallo beta laktamaz tayininde kullanılan fenotipik testler | 51 |
| 6.4 Metallo beta laktamaz enziminin moleküler yöntemle gösterilmesi | 52 |
| 6.5 Oksasilinaz enziminin moleküler yöntemle gösterilmesi | 53 |
| 6.5.1 <i>bla</i> _{OXA-23} like geninin amplifikasyonu | 53 |
| 6.5.2 <i>bla</i> _{OXA-24} like geninin amplifikasyonu | 53 |
| 6.5.3 <i>bla</i> _{OXA-51} like geninin amplifikasyonu | 53 |
| 6.5.4 <i>bla</i> _{OXA-58} like geninin amplifikasyonu | 53 |
| 6.5.5 Araştırma grubuna ait <i>bla</i> _{OXA} PCR sonuçları ve gönderildiği birimler | 54 |
| 6.5.6 OXA enzimi üreten izolatların karbapenem duyarlılık verileri | 58 |
| 6.5.7 OXA enzimi üreten genlerin birlikte bulunma durumları | 58 |
| 6.5.8 DNA dizi analizi | 58 |
| 7. TARTIŞMA ve SONUÇ | 59 |
| 8. SONUÇLAR | 73 |
| 9. KAYNAKLAR | 74 |
| 10. ETİK KURUL ONAYI | 93 |
| 11. ÖZGEÇMİŞ | 96 |

TABLOLAR DİZİNİ

| Tablo | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 1. <i>Acinetobacter</i> genomik türler | 7 |
| Tablo 2. Beta laktamazların sınıflandırılması | 17 |
| Tablo 3. Plazmid ve kromozom aracılığı ile sentezlenen enzimler ve enzimlerin substratları | 19 |
| Tablo 4. Karbapenem direnç mekanizması | 20 |
| Tablo 5. Kromozomal kökenli MBL sentezleyen bakteriler ve enzimleri | 23 |
| Tablo 6. İzolat kodu, izolasyon tarihi ve materyalin gönderildiği birim | 32 |
| Tablo 7. PCR için master mix bileşenleri ve miktarları | 41 |
| Tablo 8. MBL enzim direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler | 42 |
| Tablo 9. OXA enzim direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler | 43 |
| Tablo 10. ABC izolatlarının gönderildikleri birimlere göre dağılımı | 48 |
| Tablo 11. Karbapenem orta duyarlı ve dirençli 74 ABC izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları | 49 |
| Tablo 12. MBL üretimini araştırmak için kullanılan iki fenotipik yöntemle pozitif ve negatif bulunan izolat sayısı | 52 |
| Tablo 13. Araştırma Grubuna ait <i>bla_{OXA}</i> PCR Sonuçları | 54 |
| Tablo 14. OXA-23 ve OXA-58 pozitif izolatların gönderildiği birimler | 56 |
| Tablo 15. OXA pozitif izolatların karbapenem grubu antibiyotik duyarlılık verileri | 58 |
| Tablo 16. İzolatlardaki OXA genlerinin birlikte bulunma durumları | 58 |
| Tablo 17. OXA pozitif izolatların tespit edildiği birimler ve yıllara göre dağılımı | 70 |

RESİMLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Resim 1. <i>A. baumannii</i> için OXA enzim altgrupları | 30 |
| Resim 2. Kombine disk testi ile fenotipik olarak MBL üretimi | 51 |
| Resim 3. MHT ile fenotipik olarak MBL üretimi | 52 |
| Resim 4. <i>bla</i> _{OXA} geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü | 53 |

KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

| | |
|-------------|--|
| ABC | <i>A. baumannii</i> complex |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CDC | Centers of Disease Kontrol and Prevention |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards İnstitute |
| dNTP | Deoksinükleotitrifosfat |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| GSBL | Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz |
| KHDL | Karbapenem Hidrolize eden sınıf D beta laktamazlar |
| IS | İnsersiyon sekans |
| MBL | Metallo-beta-laktamaz |
| MİK | Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu |
| MHA | Mueller Hinton Agar |
| MHT | Modifiye Hodge Testi |
| MPA | Merkaptopropiyonik asit |
| NaCl | Sodyum klorür |
| OXA | Oksasilinaz |
| PFGE | Pulse-field jel elektroforezi |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris, Borik asit, EDTA |
| TE | Tris, EDTA |
| Tris | Trihidroksietanolamin |
| YBÜ | Yoğun Bakım Ünitesi |
| Bp | Base pair (baz çifti) |

1. ÖZET

***Acinetobacter baumannii* complex Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması**

Karbapenemler, çoğul dirençli *A. baumannii* complex (ABC) izolatlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda genellikle son çare antimikrobiyal ajanlardır. Fakat karbapenemleri hidrolize eden beta laktamazlar, karbapenem kullanımına paralel olarak artan oranlarda bildirilmektedir. Metallo beta laktamazlar (MBL) ve karbapenemleri hidrolize eden oksasilinaz türleri (OXA), karbapenemlere dirence neden olan beta laktamazlardır ve aynı zamanda horizontal yayılım açısından önem arz etmektedir.

MBL ve OXA karbapenemaz grubu enzimleri üreten ABC ile enfekte hastaların tedavilerinde uygun antibiyotiklerin seçilebilmesi ve direncin bakteriler arasında mobil elemanlarla (plazmid ve transpozon gibi) yayılımının önlenmesi için bu enzimlerin varlığının belirlenmesi son derece önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, karbapenem dirençli izolatlarda MBL ve OXA enzimlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılmasıdır. Bu amaçla; Ocak 2007-Aralık 2009 tarihleri arasında 74 hastanın kan örneğinden izole edilen imipenem ya da meropenem orta duyarlı ve dirençli ABC izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. Fenotipik testlerden kombine disk testi ve modifiye Hodge testi (MHT) uygulanmıştır. Fenotipik test sonuçları PCR ve DNA dizi analizi yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

ABC izolatlarının kombine disk testi ile 4' ünün (%5.4), MHT ile sadece birinin (%1.35) MBL ürettiği saptanmıştır. PCR yöntemi ile *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* ve *bla_{SPM}* genleri araştırılmış ancak izolatların hiçbirinde bu genler tesbit edilmemiştir.

Oksasilinaz genlerinden PCR ile; 26 izolatta *bla_{OXA-23}* geni, 32 izolatta *bla_{OXA-58}* geni ve tüm izolatlarda *bla_{OXA-51}* geni bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *bla_{OXA-24}* geni saptanmamıştır. Üç izolatta *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}* ve *bla_{OXA-51}* genlerinin birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların bir tanesinde *bla_{OXA-23}* *bla_{OXA-58}* ve *bla_{OXA-51}* genlerinin varlığı DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanmıştır.

Çalışmamızın sonuçları hastanemizde dirençli suşların yayılımının önlenmesi ve uygun ampirik tedavinin belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: *A. baumannii* complex, Karbapenem direnci, Kombine disk testi, Modifiye Hodge Test, Metallo Beta Laktamaz, Oksasilinaz, DNA dizi analizi

2. SUMMARY

Investigation of Molecular Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* complex from Clinical Isolates

Carbapenems are usually last resort antimicrobial agents used in serious infections caused by multi-resistant *A. baumannii* complex (ABC) strains. However, beta lactamases, which hydrolyze carbapenems, have been increasingly reported in parallel with the use of carbapenem. Metallo beta lactamase (MBL) and oxacillinase types (OXA), are beta lactamases, which hydrolyze carbapenems, therefore, cause resistance to carbapenems and also important in terms of horizontal propagation.

To determine the presence of these enzymes in the treatment of patients infected with ABC that produce MBL and OXA group of carbapenemase enzymes is extremely important for the prevention of the spread of the resistance between bacteria by mobile elements (such as plasmid and transposon) and selection of appropriate antibiotics.

The purpose of this study is to investigate MBL and OXA enzymes in carbapenem resistant isolates using phenotypic and molecular methods. For this purpose, 74 imipenem or meropenem resistant and moderately susceptible ABC strains isolated from blood samples of patients admitted to hospital between January 2007 and December 2009 were included. Of the phenotypic tests, combined disk test and the modified Hodge test (MHT) were applied. Phenotypic test results were compared with PCR and DNA sequencing methods.

Four ABC isolates (5.4%) with combined disc test and only one isolate (1.35%) with MHT identified producing MBL. Using PCR method *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{SPM} genes are searched, but none of them were found in the isolates.

Of the oxacillinase genes, *bla*_{OXA-23} gene in 26 isolates, *bla*_{OXA-58} gene in 32 isolates, and *bla*_{OXA-51} gene in all isolates were determined by PCR. *bla*_{OXA-24} gene was not found in none of the isolates. In three of the isolates *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-51} genes were found together. In one of these isolates, the presence of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-58} was confirmed by using DNA sequencing method.

The results of this study will help to prevent the spread of resistant strains in our hospital and to determine the appropriate empiric therapy.

Key words: *A. baumannii* complex, Carbapenem resistance, Combined disc test, Modify Hodge Test, Metallo Beta Laktamaz, Oxacillinase, DNA sequencing method

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Nonfermentatif gram negatif basil olan *Acinetobacter* türleri epidemilere yol açan hastane enfeksiyonu etkenleridir. Hastane kaynaklı sepsis, pnömoni, menenjit, idrar yolu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen fırsatçı patojenlerdir. *Acinetobacter* türleri, antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç geliştirebilmesi ve hastane ortamında uzun süre canlı kalabilme özellikleri nedeniyle; hastaları kolaylıkla kolonize edebilmekte, hastane personeli aracılığı ile veya solunum cihazları gibi ekipmanlarla diğer hastalara yayılmakta ve epidemilere neden olabilmektedirler (1,2).

Acinetobacter türleri ampisilin, amoksasilin ve birinci kuşak sefalosporinler gibi birçok antibiyotiğe doğal dirençlidirler. Beta laktamaz enzim üretimi (TEM-1, beta laktamazlar, AmpC sefalosporinazlar, karbapenemazlar), dış zar porinlerindeki değişiklik, penisilin bağlayan proteinlerindeki değişiklik ve efflux pompa aktivitesi antibiyotiklere karşı başlıca direnç mekanizmalarıdır (3, 4). Bu mekanizmalar aracılığı ile birden fazla farklı sınıf antibiyotiğe kolayca direnç geliştirmekte ve çoğul dirençli *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonların sayısı hızla artmaktadır.

Karbapenemler, çoğul dirençli ABC izolatlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda genellikle son çare antimikrobiyal ajanlardır. Fakat karbapenemleri hidrolize eden beta laktamazlar da karbapenem kullanımına paralel olarak artan oranlarda bildirilmektedir (5, 6, 7).

Karbapenemleri hidrolize eden beta laktamazlar (karbapenemazlar) Ambler sınıflamasında üç grupta yer alırlar. Bunlardan metallo beta laktamazlar ve oksasilinazlar karbapenem direncine en sık sebep olan karbapenemazlardır.

Sınıf B' de enzimin aktif bölgesi çinko iyonu içerir ve Metallo Beta Laktamaz (MBL) olarak sınıflandırılan bu grup klasik beta laktam inhibitörlerine dirençlidirler. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta laktamları ve karbapenemleri hidrolize edebilmeleridir. EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Aminoasit dizilim homolojisini araştırılarak yapılan çalışmalarda 5 tip MBL saptanmıştır. Bunlar IMP, VIM, SIM, SPM ve GIM tipi MBL' dir. Fakat bu tiplerden yalnızca ilk üçü *Acinetobacter* türlerinde tanımlanmıştır. MBL

türlerinin dağılımı bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte en yaygın görülenler IMP ve VIM türevleridir. MBL' leri kodlayan genler genelde sınıf 1 (bazen sınıf 3) integronlarca taşınan ve bakteriler arasında kolayca yayılabilen genetik elemanlardır.

Sınıf D karbapenemazlar; aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunan, EDTA ile inhibe olmayan serin karbapenemazlardır. Sınıf D karbapenemazlar, oksasilinaz aktiviteleri dikkate alındığından OXA tipleri olarak sınıflandırılırlar. Çeşitli çalışmalarda farklı OXA karbapenemaz alt grupları büyük oranda *Acinetobacter* cinsi bakterilerde saptanmıştır. Alt gruplar aminoasit homolojisine göre; birinci, ikinci ve üçüncü alt gruplar sırasıyla OXA-23 benzeri, OXA-24 benzeri ve OXA-51 enzimler, sekansları temel alınarak belirlenmiştir. Bu üç alt grup kromozomal olarak ya da plazmid aracılığı ile bakteriler arasında aktarılabilmektedirler. Pek çok farklı ülkede tanımlanan alt gruplar arasında OXA-51 benzeri enzimlerin test edilen *A. baumannii* kökenlerinde pozitif çıkmış olması, bir alt popülasyonunun kromozomunda bu enzim genlerinin doğal olarak bulunuyor olabileceğini düşündürmüştür. Dördüncü alt grupta bulunan ve plazmid aracılığı ile ya da kromozomal olarak aktarılmakta olan OXA-58 pek çok ülkenin yanı sıra ülkemizde de saptanmıştır.

ABC türleri ile enfekte hastaların optimal tedavisinin belirlenmesi ve karbapenemaz üreten bakterilerin mobil elemanlarla (plazmid ve transpozon gibi) yayılımının önlenmesi için MBL ve OXA enzimlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle saptanması gerekmektedir (3, 4, 6).

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilmiş karbapenem orta duyarlı ve dirençli ABC izolatlarında OXA ve MBL enzimlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 *Acinetobacter* spp.

4.1.1 Tarihçe ve taksonomi

Acinetobacter türleri ilk kez 1911' de Alman mikrobiyolog Martinus W. Beijerinck (1851–1931) tarafından topraktan izole edilmiştir. *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Alcaligenes*, B5W, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii* gibi 15' in üzerinde farklı isimle anılmıştır (1, 2, 3). Paul Baumann 1968' de, Roger Y. Stanier (1916–1982) ve Michael Doudoroff (1911–1975) bu mikroorganizmaları *Acinetobacter* adlı tek bir cins içinde toplamışlardır. Bergey' in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı' nda (Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology) *Acinetobacter* cinsi *A. calcoaceticus* adlı tek tür ile *Neisseriaceae* ailesi içinde incelenmektedir. *Acinetobacter* cinsi, *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cinslerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır. *Acinetobacter*, 17' si DNA hibridizasyonu metoduyla isimlendirilmiş toplam 32 farklı genomik tür içermekteyken bunlara ek olarak *A. beijerinckii* ve *A. gyllenbergii* türlerinden de bahsedilmiştir (Tablo 1) (1, 2, 4). *Acinetobacter*; Towner' ın yaptığı çalışmayla 18' i moleküler yöntemlerle isimlendirilmiş toplam 33 tür içermektedir (1). *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter genomic species 3* ve *Acinetobacter genomic species 13TU* birçok yönden benzerlik gösteren, fenotipik yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilmesi zor olan türlerdir ve *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi adı altında incelenmektedir (3, 4). *Acinetobacter* genomik türleri Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. *Acinetobacter* genomik türler

| Türler | Genomik tür | Referans izolat |
|-------------------------|-------------|-------------------------|
| <i>A. baumannii</i> | 2 | ATCC 19606 ^T |
| <i>A. baylyi</i> | | DSM 14961 ^T |
| <i>A. bouvetii</i> | | DSM 14964 ^T |
| <i>A. calcoaceticus</i> | 1 | ATCC 23055 ^T |
| <i>A. gernerii</i> | | DSM 14967 ^T |

Tablo 1' in devamı

| | | |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| <i>A. grimontii</i> | | DSM 14968 ^T |
| <i>A. haemolyticus</i> | 4 | ATCC 17906 ^T |
| <i>A. johnsonii</i> | 7 | ATCC 17909 ^T |
| <i>A. junii</i> | 5 | ATCC 17908 ^T |
| <i>A. lwoffii</i> | 8/9 | ACTC 15309 ^T |
| | | ATCC 9957 |
| <i>A. parvus</i> | | NIPH384 ^T |
| <i>A. radioresistens</i> | 12 | IAM 13186 ^T |
| <i>A. schindleri</i> | | NIPH1034 ^T |
| <i>A. tandoii</i> | | DSM 14970 ^T |
| <i>A. tjernbergiae</i> | | DSM 14971 ^T |
| <i>A. towneri</i> | | DSM 14962 ^T |
| <i>A. ursingii</i> | | NIPH137 ^T |
| “ <i>A. venetianus</i> ” | | ATCC 31012 |
| | 3 | ATCC 19004 |
| | 6 | ATCC 17979 |
| | 10 | ATCC 17924 |
| | 11 | ATCC 11171 |
| | 13TU** | ATCC 17903 |
| | 13BJ, 14TU | ATCC 17905 |
| | 14BJ* | CCUG 14816 |
| | 15BJ | SEIP 23.78 |
| | 15TU | M 151a |
| | 16 | ATCC 17988 |
| | 17 | SEIP Ac87.314 |
| | Between 1 and 3 | 10095 |
| | Close to 13TU | 10090 |

BJ*: Bouvet and Jeanjean

TU**, Tjernberg and Ursing (Bergogne ve Peleg' den, 3, 4)

4.1.2 Genel mikrobiyolojik özellikler

Acinetobacter izolatları çoğunlukla kapsüllü, kısa, hareketsiz, gram negatif 1.0-2.5 µm boyutlarında kokobasillerdir. Katı besiyerlerinde üreyen koloniler düzgün, opak, yumuşak, bazen mukoid ve grimsi-beyaz olmalarına rağmen bazı çevresel izolatlarda kahverengi pigment üretimine rastlanmaktadır. Saf kültürden alınan gram boyamalarda değişkenlik göstermesinin yanı sıra, hücre boyutunda da çeşitlilik görülebilir (3, 4). Pozitif kan kültürü şişelerinden hazırlanan direk yaymalarda gram pozitif kok görünümünde olabileceği de vurgulanmaktadır (5). *Acinetobacter'* in tüm üyeleri zorunlu aerob, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve nonfermentatif bakterilerdir. Oksidaz testinin negatifliği *Acinetobacter* izolatlarının diğer nonfermentatif bakterilerden hızlı bir şekilde ayırımı sağlamaktadır. Birçok izolat nitratı nitrite indirgeyememektedir (6).

Genel üretim besiyerlerinde 35-37°C' de kolayca üretilebilirler. Kanlı agardaki kolonileri 24 saat sonunda 2-3 mm çapına ulaşırlar ve bazı klinik izolatlar, özellikle genomik tür 4 (*A. haemolyticus*), kanlı agarda hemoliz yapabilir ve Eozin Metilen Blue Agar' da laktoz negatif koloniler oluştururlar. MacConkey Agar' da renksiz ya da hafif pembe koloniler oluşturabilirler (5). Klinik örneklerden izole etmek için safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru içeren Herelea Agar gibi seçici ayırtıcı besiyerleri geliştirilmiştir. Seçici besiyerleri antibiyotikler kullanılarak modifiye (Leeds *Acinetobacter* medium gibi) edilmiştir (3, 4). Gaita gibi floralı örneklerden izole etmek için ek bir karbon ve enerji kaynağı, nitrojen kaynağı olarak amonyum veya nitrat tuzları içeren pH 5.5-6.0 olan sıvı mineral besiyerine inoküle edilerek izole etmek mümkündür. Sıvı besiyerindeki örnek, kuvvetlice sallanarak 24-48 saat inkübasyon sonrası seçici besiyerine inoküle edilmektedir. Dışkı gibi çeşitli klinik ve çevresel örneklerden *Acinetobacter* izolasyonunda bu yöntem kullanılmaktadır (3).

Türler arasında ayırım yapmak için geleneksel biyokimyasal metodlar yeterli olmamaktadır. Ticari sistemlerden; API 20 NE (bioMerieux, Fransa) beş tür identifiye edebilirken, Biolog GN2 Microplate (Biolog, Hayward ABD) 15 tür identifiye edebilmektedir.(6, 7)

4.1.3 Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri sağlıklı bireylerin en az %25' inde; koltuk altı, kasık, parmak arası gibi nemli bölgelerin deri florasında bulunabilmektedir (8). Sağlıklı bireylerin ağız boşluğunda bulunabilirler (9, 10). *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklıdır ve cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Doğada nemli bölgelerde bulunmaları; kontaminasyonu ve bakterinin çeşitli yüzeylerde uzun süre canlı kalabilirliğini mümkün kılmaktadır (11). Hastane ortamında; enfekte hastalardan ya da kolonizasyon belirlenen hastalardan kolayca çevreye yayılması uzun süren salgınlarla ilişkilendirilebilir (3). İnsan deri ve mukoza membranında daha önce hastanede kalmayan bireylerin %43' ünden fazlasında kolonizasyon tespit edilmiştir. En sık izole edilen türler *A.lwoffii* (%58), *A. johnsonii* (%20), *A. junii* (%10) ve *Acinetobacter* genomik tür 3 (%6) olarak raporlanmıştır (12). Sağlıklı gönüllü bireylerin %44' ünün taşıyıcılık yüzdeleri; *A. lwoffii* (%61), *Acinetobacter* genomik species 15BJ (%12), *A. radioresistens* (%8) ve *Acinetobacter* genomik species 3 (%5) olarak bulunmuştur (13). Birçok salgında cilt ve boğaz florası, solunum veya sindirim sisteminde büyük oranda *Acinetobacter* türleri kolonizasyonu bildirilmiştir. Yoğun Bakım Üniteleri' nde (YBÜ) yatan hastalarda solunum sistemi kolonizasyonunun yüksek oranda görülmesi, ekipmanları kontamine ederek salgınlarına yol açtığı gösterilmiştir. Salgınlar sırasında hastaların cildinin kolonizasyonu, hastane personelinin ellerinin kontamine olması sonucu salgının devam etmesine ve hastane içerisinde yayılmasına neden olmaktadır. Sindirim sisteminde kolonizasyona nadir rastlanmaktadır (3).

In vitro çalışmalar; formika, seramik, paslanmaz çelik, kauçuk, polivinil klorür içeren çeşitli yüzeylerde yaşayabileceğini göstermiştir. Wenth ve arkadaşları *A. baumannii* izolatlarının seramik, polivinil klorür, kauçuk ve paslanmaz çelik yüzeylerde koloni sayılarını 2 hafta sonra en az 10^2 cfu/ml (colony forming unit) olarak bulmuşlardır (14). Yatak rayları, minder, perde, hasta kaldırma askısı, temizlik için kullanılan bezler, kovalar, kapı kolları, lavabolar, ventilatör yüzeyleri, ekipmanlar, steteskoplar, resüsitasyon ekipmanları ve bilgisayar klavyeleri kolonizasyon olduğu bölgelerdir (9, 15). En çok solunum yolu ekipmanları ve cihazlarında kolonize olmaktadır (16). Jawad ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada *Acinetobacter* türlerinin salgın ve sporadik izolatların kuru yüzeylerde ortalama yaşama sürelerini 21 ile 31 gün arasında bulmuşlardır (17).

4.1.4 Virülans faktörleri

Acinetobacter türleri düşük virülansa sahip patojenlerdir. Bazı enfeksiyonlarda bu organizmaların virülansı artabilir. Biyofilm üretimi, antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasına olanak sağlamak suretiyle enfeksiyonların patogenezine katkıda bulunmaktadır (18). PER-1 beta-laktamaz geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma ve epitel hücrelere adezyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (19). İnsan epitelyal hücrelerine adezyonunu polisakkarit kapsül ve fimbria ile yapmaktadır. Doku lipitlerine zarar veren ekstrasellüler enzim üretebilmektedir. Hücre duvarının lipopolisakkarit bileşeni lipid A ile endotoksin üretmektedir (20).

Quorum sensing sistemi bakterinin regülasyon mekanizmasıdır. N-açıl homoserin lakton yapısındaki sinyal moleküllerinin rol oynadığı sistem, uygun olmayan çevresel koşullarda adaptasyonunu sağlayabilir.

Bazı *Acinetobacter* izolatlarının demiri sağlama kabiliyeti önemli bir virülans belirleyicisidir. *A. baumannii*'nin siderofor aracılı kazanım sistemi olan asinetobaktin ilk kez *A. baumannii* 19606 izolatında tanımlanmış ve bunun hemin kazanım sistemlerine de katkı sağladığı bildirilmiştir (21, 22).

4.1.5 *Acinetobacter* enfeksiyonlarının patogenezi

Acinetobacter türleri ile ilişkilendirilen risk faktörleri, enfeksiyona yatkınlığı kolaylaştırmaktadır (3). Mikroorganizma hastadan hastaya geçebilir, kolonize ve enfekte hastalar *A. baumannii* için önemli rezervuardır (23). Cerrahi ve invaziv işlemleri takiben endotrakeal tüp takılması ve katater kullanılması kolonizasyonla ilişkili bulunmuştur. Yanık hastalarında kolonizasyonu takiben ortaya çıkan bakteriyemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (24). Kolonizasyonu invaziv enfeksiyonlar izleyebilir (25). Cerrahi sonrası, altta yatan ciddi hastalık tablosuna (malignite, yanık ya da immunbaskın) sahip olanlarda, özellikle yaşlı bireylerde fırsatçı *Acinetobacter* enfeksiyonları görülmüştür. Uzun süre YBÜ'nde kalma, antibiyotik kullanımı, mekanik ventilatöre bağlı kalma, damar içi kateterizasyon, idrar sondası, endotrakeal tüp, trakeostomi ve enteral beslenme enfeksiyon için başlıca risk faktörleridir (26, 27). Hastane enfeksiyonlarında ABC ile ilişkilendirilen birçok salgın bildirilmiştir. Hastane

kaynaklı salgınlarda sıklıkla solunum yolu ekipmanları, hastane personelinin elleri yolu ile yayılmaktadır (28).

4.1.6 *Acinetobacter* kökenleriyle oluşan hastane kaynaklı enfeksiyonlar

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar 'Centers of Disease Control and Prevention' tanımına göre hastanın hastaneye başvurduğunda veya hastaneye yattığında henüz inkübasyon döneminde olmayan, hasta yatışından en az 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan 10 gün içinde ortaya çıkan enfeksiyonlardır (29). YBÜ, dializ üniteleri, transplantasyon üniteleri, yanık üniteleri, yenidoğan servisleri diğer hastane birimlerine kıyasla hastane kaynaklı enfeksiyonlar için daha fazla risk altındadır. *Acinetobacter* 1970' lerin sonlarında hastanelerde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artmasının olası sonucu olarak önemli hastane kaynaklı patojen olarak dikkat çekmektedir (1). Dünya çapında YBÜ' deki kritik hastalarda *A. baumannii* enfeksiyonları giderek daha yaygın hale gelmektedir (30). *Acinetobacter* türlerinin YBÜ' lerde görülme sıklığı kullanılan invaziv tanı ve tedavi işlemleri ile ilişkili olduğu dikkat çekmektedir. Hastane ortamında özellikle YBÜ' deki mekanik ventilasyona bağlı hastalarda, yara veya yanık gibi travmatik durumu olan hastalarda temel sorunlar çoğunlukla *Acinetobacter* kaynaklı olmaktadır (31).

4.1.6.1 Solunum yolu enfeksiyonları

Hastane kaynaklı pnömoni *Acinetobacter* türlerinin sıklıkla sebep olduğu solunum yolu enfeksiyonudur. Birçok vakada pnömoni tablosunu, üst solunum yollarında kolonizasyondan ayırt etmek zordur. Nörocerrahi, akut respiratuar distress sendromu, kafa travması, aspirasyon, antibiyotik terapisi ve el yıkama alışkanlığının zayıf olması *Acinetobacter* türlerinin sebep olduğu ventilatörle ilişkili pnömoni tablosu için risk faktörleridir (32). Amerika' da yapılan sürveyans çalışmasında YBÜ' deki pnömoni vakalarının %5-10' u *A. baumannii* nedeniyle olmuştur (4). Bazı çalışmalarda *Acinetobacter* kökenli hastane kaynaklı pnömonilerde mortalite oranı %70 olarak rapor edilmiştir (33). YBÜ' de yatma, ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, cerrahi, immünoşüpresyon, antimikrobiyal ilaç kullanımı, trakeostomi ve endotrakeal entübasyon gibi risk faktörlerinin varlığı *Acinetobacter* kökenlerine bağlı pnömoni oluşma riskini arttırmaktadır (3). Atlanta' da yapılan bir çalışmada *Acinetobacter*

kaynaklı YBÜ pnömoni olguları 1986 yılında %4 iken 2003' de %7' ye yükselmiştir (34).

Hastaneye yatış, hemodiyaliz, sağlık bakım evlerinde yaşama, ayaktan intravenöz tedavi ve evde bası yarası tedavisi öyküsü bulunan kişilerde gelişen pnömoniler, sağlık bakımı ile ilişkili pnömoni (SBİP) olarak adlandırılmaktadır (35, 36). SBİP etkenleri arasında, *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Staphylococcus aureus* gibi potansiyel olarak çoğul dirençli etkenler önemli yer tutmaktadır (37).

Acinetobacter izolatlarının neden olduğu toplum kaynaklı pnömoni olgularına nadir rastlanmaktadır. Yaş ortalaması 56 ve 73 arasındaki bireyler için bildirilen risk faktörleri sigara kullanımı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet, organ yetmezliği ve malignitelerdir (38).

4.1.6.2 Bakteriyemi

Bazı durumlarda cilt florası ile kan numunelerinin kontaminasyonu, bakteriyemi ile ayrımı zorlaştırmaktadır. *Acinetobacter* türleri, tek bir patojen olarak ya da polimikrobiyal bakteriyeminin bir parçası olarak bulunabilir. Erişkin hastalarda bakteriyemiye sebep olan *Acinetobacter* türleri arasında en çok dikkat çeken *A. baumannii*' dir. İmmunbaskın hastaların büyük çoğunluğunu, erişkin hastalar oluşturmaktadır. Yenidoğanlarda daha az sıklıkla görülmektedir. Düşük doğum ağırlığı, öncesinde antibiyotik kullanımı, mekanik ventilasyon ve yenidoğan konvülsiyonları septisemi için risk faktörleridir (3).

A. baumannii etken olduğu hastane kaynaklı bakteriyemiler diğer servislere göre YBÜ' de daha fazla görülmektedir (39, 40). YBÜ' de *P. aeruginosa* ve *Candida* spp. enfeksiyonlarından sonra en sık üçüncü etken olarak görülmektedir (4). Hastanın YBÜ' de kalması, cerrahi operasyon geçirmesi, mekanik ventilasyon, hiperalimentasyon, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, intravenöz kateter varlığı *A. baumannii* bakteriyemisi predispozan faktörlerdir (41, 42). İntravenöz ve solunum yolu kateteri bakteriyemilere sebep olan en yaygın kaynaktır. Kateterin her 48 saatte ve aseptik koşullarda değiştirilmesi bu riski azaltabilir (43). Cerrahi yara, yanık, idrar yolları enfeksiyonlarında daha az sıklıkla kaynak olmaktadır.

Solunum yolları ve cerrahi yara enfeksiyonlarının akabinde gelişen bakteriyemide *A. baumannii* en önemli etkenlerden biridir (39). Hastaneye yatıştan sonraki ortalama 26 gün içinde olabilecek tüm bakteriyemilerde *A. baumannii* etken olabilir (40).

4.1.6.3 Menenjit

Acinetobacter; primer menenjit tablosunda sporadik vakalar ile seyrederken, daha baskın olarak nörocerrahi ya da kafa travması sonrasında sekonder menenjit etkenidir (44, 45). Risk faktörleri olarak ventrikülostomi, serebrospinal fistül, beş günden daha fazla süreli ventriküler kateter varlığı ve yoğun antibiyotik kullanımı tanımlanmıştır. *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu hastane kaynaklı menenjitlerde mortalite oranları %15-40 kadardır. Gelişmekte olan ülkelerde bu oran %70' lere kadar çıkabilir (45, 46).

4.1.6.4 İdrar yolu enfeksiyonu

Acinetobacter türlerine, hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarına nadir rastlanmaktadır. Genelde çok yaşlı düşkün, YBÜ' de uzun süre kalanlarda ve kalıcı olmayan üriner kateterli hastalarda idrar yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır (3). Kateterle ilişkili enfeksiyon ya da kolonizasyonla ilişkilendirilmiştir. Ayaktan hastalarda idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olması olası değildir (4).

4.1.6.5 Yumuşak doku enfeksiyonları

Acinetobacter türleri özellikle ağır yanık ve travmatik yarası olan hastalarda fırsatçı enfeksiyona neden olur. Irak ve Afganistan' da savaş sırasında yaralanan askerlerin, yaralarından izole edilmiştir (47). Bir çalışmada *Acinetobacter* türleri yoğun bakım ünitesindeki cilt ve doku enfeksiyonlarının %2.1' inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (4, 32).

4.1.6.6. Diğer enfeksiyonlar

Acinetobacter türlerine bağlı normal kapak enfektif endokarditi vaka raporları az sayıda bildirilmiştir (48, 49). Çoğunlukla vakalarda protez kapak endokarditi bildirilmiştir. *Acinetobacter* türleri; lens kullanımı ve cerrahi sonrası gelişen endoftalmit ve keratit gibi göz enfeksiyonlarına da neden olabilir (50, 51).

Shiga toksin üreten *A. haemolyticus* izolatı, tek bir vakada 3 aylık bebekte kanlı ishale neden olmuştur (52). *Acinetobacter* türleri sürekli peritoneal diyaliz olan hastalarda peritonite neden olmaktadır (53).

4.2 A. baumannii complex enfeksiyonlarının tedavisi

A. baumannii enfeksiyonlarında; direnç oranlarının artışına rağmen, hala geniş spektrumlu penisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler veya bu grup antimikrobiyal ajanların aminoglikozit veya kinolon grubu ajanlardan biri ile kombinasyonu tedavide en sık kullanılan rejimlerdir. Bu kombinasyonlardan etkinliği en çok araştırılan; geniş spektrumlu beta laktam-aminoglikozit, beta laktam-kinolon veya kinolon-aminoglikozit grubundan oluşan antibiyotiklerdir. *Acinetobacter* türlerinin karbapenemlerle amikasin veya netilmisin gibi aminoglikozitlerin sabit konsantrasyonda kombinasyonunda antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre (agar dilüsyon veya E-test) in-vitro ortamda yüksek sinerjistik etkileşim göstermelerinden dolayı ampirik tedavi protokollerinde imipenem-amikasin veya imipenem-netilmisin en çok yer alan antibiyotiklerdir (54, 55, 56, 57, 58, 59).

Ampisilin/ sulbaktam kombinasyonları diğer beta laktam/ beta laktamaz inhibitörlerinin kombinasyonlarına göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (60). Glisilsiklin, yeni tetrasiklinlerden, ön çalışma sonuçlarına göre karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarına in vitro aktivitesi olumlu sonuçlar vermiştir (61, 62). Ventilatör ilişkili pnömoni ve birincil ya da ikincil bakteriyemi enfeksiyonlarında tigesiklin tedavisi olumlu sonuçlar vermiştir (63, 64). Polimiksin B ya da kolistin A. *baumannii*' ye karşı bakterisidal aktivite gösterir. Çoğul dirençli *A. baumannii*' nin sebep olduğu pnömoni, sepsis, intraabdominal enfeksiyonlar ve santral sinir sistemi enfeksiyonlarında ciddi seyirli hastalarda, kolistin ile tedavi oranı %57-77 arasında bulunmuştur (59).

A. baumannii klinik izolatlarında, aminopenisilinler, üredopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, aminoglikozitler, kinolonlar, kloromfenikoller ve tetrasiklinler gibi antibakteriyel ajanlara direnç artışı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1, 3, 4). Sonuç olarak çoğul dirençli olan *Acinetobacter* türlerinde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılmasıyla karbapenemler (imipenem ve meropenem) *Acinetobacter* enfeksiyonları için tedavilerde kullanılması tercih edilen ajanlardır. Fakat

son zamanlarda karbapenem dirençli klinik izolatların dünyada artan oranlarda bildirilmesi ve bu izolatların bazılarının da tüm geleneksel antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirmesi, enfeksiyonların tedavisinde seçenekleri kısıtlamıştır (58).

4.3 Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter cinsi toprakta uzun dönem evrimleşmesine bağlı olarak antibiyotik direnci geliştirmede çok yüksek bir hıza sahiptir. Bilimsel birçok literatürde *Acinetobacter* türlerinin yüksek oranda birçok antibiyotiğe dirençli olduğu bildirilmiştir. Özellikle YBÜ' de hastane enfeksiyonlarının kaynağı olan *Acinetobacter* türlerinde çoğul direnç gözlenmesi tedavide seçenekleri sınırlandırmıştır. Gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin veya karbenisilin gibi ajanların tek başına ya da kombinasyonları 1970' lere kadar hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılıyordu. Fakat 1971-1974 yılları arasında artan oranlarda direnç farkedilmeye başlandı ve klinik *Acinetobacter* türlerinde 1975 yılından günümüze kadar direncin artışı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Günümüzde izolatların büyük bir kısmı aminopenisilinler, üreidopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, çoğu aminoglikozidler, kinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi sık kullanılan antibakteriyel ajanlara dirençlidir. *Acinetobacter* izolatları için geniş spektrumlu sefalosporinler (sefotaksim, seftazidim), imipenem, tobramisin, amikasin ve fluorokinolonlara kısmen duyarlı olmalarına rağmen son yıllarda bu antibiyotikler içinde MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri önemli ölçüde artmıştır.

Acinetobacter türlerinin antimikrobiyal ajanlara; geniş spektrumlu beta laktamaz yapımı, aminoglikozit modifiye eden enzimler, dış membran geçirgenliğinde azalma, penisilin bağlayan proteinlerin modifikasyonu, aktif pompa sistemleri ve azalmış porin ekspresyonu bilinen direnç mekanizmalarıdır (3).

4.3.1 Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Acinetobacter kökenlerinde beta laktamaz üretimine bağlı olarak beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir.

A. baumannii' nin beta laktamlara direnci üç mekanizma ile gelişir;

1. Beta laktamaz üretimi
2. Penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik

3. Porin proteinlerinin yapı ve sayısında değişiklik

4.3.2 Beta laktamazlar

Beta laktamaz üreten *Acinetobacter* kökenleri beta laktam ajanlara karşı doğal dirence sahip olabildikleri gibi, kromozomal genlerde mutasyon olması veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da direnç geliştirebilmektedir (65, 66, 69). Beta laktamazlar beta laktam halkası üzerine etki göstererek kovalent açıl ester oluşturan ve esterin hidrolizi sonucu beta laktam antibiyotiği inaktif hale getiren enzimlerdir. Gram negatif bakterilerde periplazmik aralıkta bulunan enzim, gram pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır.

Beta laktamazların moleküler sınıflandırması Ambler tarafından 1980 yılında yapılmıştır. Bu sınıflandırma Bush tarafından 1989 yılında geliştirilmiş ve önceki sınıflandırmada kullanılan substrat profilleri geliştirilerek beta laktamaz enzimleri dört grupta toplanmıştır (66). Beta laktamazlar bu sınıflandırmada A, B, C, D olmak üzere dört grupta toplanmaktadır. A, C ve D grubu beta laktam antibiyotiklerin aktif olması için serine ihtiyaç duyduklarından dolayı serin beta laktamazlar olarak adlandırılırlar. Grup B enzimleri ise aktivite için çinkoya gereksinim duyan metallo beta laktamazlardır (MBL). Beta laktamazların en yeni sınıflandırma şeması 1995 yılında yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasıdır. Bu son sınıflandırma, 1989 yılında Karen Bush' un yaptığı sınıflandırmanın bir uyarlamasıdır. Enzimler, substrat ve inhibitör profillerine göre gruplandırılmıştır. Bu sistemde dört kategori ve çok sayıda alt grup bulunmaktadır (68). Beta laktamaz enzimlerinin sınıflandırması Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Beta laktamazların sınıflandırılması

| BMJ* Sistemi | Önemli alt gruplar | Ambler sistemi | Öncelikli substrat/Temel Özellikler/ Enzimler |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|---|
| Grup 1 | | C (safolosporinazlar) | Karbapenem hariç bütün beta laktamlara dirençli, klavulanik asit ile inhibe olmazlar. Kromozomal enzimler: Sınar, CMY-3b, Yent, Pstu. Plazmid kökenli enzimler: CMY-1-9, FOX-1-5, LAT-1-4, M1R-1, M0X-1-2, ACT-I, ACC-1 |

Tablo 2' nin devamı

| | | | |
|---|-----|-----------------------------|--|
| Grup 2 | 2a | A | Stafilokok penisilinazları |
| Penisilinazlar (Klavulanik aside duyarlı) | | (serin beta laktamazlar) | |
| | 2b | A | Penisilinler dar spektrumlu sefalosporinler; TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-19, ROB-1 |
| | 2be | A | Penisilinler, sefamisinler hariç tüm sefalosporinler, monobaktamlar, Geniş spektrumlu TEM ve SHV türevi enzimler, PER-1, PER-2, CTX-M, TOHO1-2 |
| | 2br | A | Penisilinler, inhibitöre dirençli TEM (IRT)' ler, SHV-10, SHV-26 (SHV kökenliler GSBL etkisindedir) |
| | 2c | A | Penisilin, Karbenisilin/ PSE-1,PSE-3, PSE-4, BRO-1-3, CARB3-5. |
| | 2e | A | Klavulunat ile inhibe olan sefalosporinazlar |
| | 2f | A | Penisilin, sefalosporin, karbapenemler. monobaktamlar/Klavulanik asit ile inhibe olan karbapenemazlar: IMI-1, NMC-A, Sme-1-2, KPC-1, GES |
| | 2d | D (oksasilin hidrolizi) | Oksasilin, penislin/ Dar spektrumlu: OXA1-10, OXA-20-27, OXA-30-31 GSBL etkinliğindekiler: OXA-1 1-19, OXA-28 Karbapenemleri hidrolize edenler: OXA-23-27, OXA-24/40, OXA-58, OXA-48 |
| Grup 3 | 3a | B | Monobaktamlar hariç tüm beta |
| Metallo beta Laktamazlar | | (metallo enzimler) | laktamlar. BC-II,CcrA.B, PCM-1, L-1, IMP-1 |

Tablo 2' nin devamı

| | | |
|----------------------|---|---|
| 3c | B | Legionella metallo-beta laktamazı |
| <i>Sınıflanmamış</i> | | Çoğunluğu dizi analizi yapılmamış, çeşitli enzimler |

(Giamarellou, Drawz ve Bush' dan, 6, 67, 68). *BJM: Bush, Jacoby, Medeiros.

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

Ambler Sınıf B: Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren MBL' lerdir.

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

Ambler Sınıf D: Oksasilini hidrolize eden serin beta laktamazlardır (67, 68).

4.3.2.1 Kromozomal beta laktamazlar

A. baumannii izolatları AmpC türü sefalosporinazları kromozomal olarak kodlar ve *Acinetobacter* kaynaklı sefalosporinazlar (ADC) olarak bilinirler. Birinci kuşak sefalosporinleri, üreidopenisilinleri ve aminopenisilinleri oldukça etkin hidrolize eder. AmpC gen ekspresyonunu ve geniş spektrumlu sefalosporinlere direnci *bla_{ampC}* geninin üst kısmına insersiyon sekans (IS) eklenmesi belirler (65). Plazmid ve kromozom aracılığı ile sentezlenen enzimler ve enzimlerin substratları Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Plazmid ve kromozom aracılığı ile sentezlenen enzimler ve enzimlerin substratları

| ENZİM/İZOLAT | LOKASYON | SUBSTRAT |
|--------------|----------|--------------|
| EM-1 | Plazmid | Penisilin |
| TEM-2 | Plazmid | Penisilin |
| CARB-5 | Plazmid | Penisilin |
| ARI-1 | Plazmid | Karbapenem |
| NCTC7844 | Kromozom | Sefalosporin |
| ML4961 | Kromozom | Sefalosporin |
| ACE-1 | Kromozom | Sefalosporin |

| | | |
|-------------|----------|--------------|
| ACE-2 | Kromozom | Sefalosporin |
| ACE-3 | Kromozom | Sefalosporin |
| ACE-4 | Kromozom | Sefalosporin |
| SHV-benzeri | - | Penisilin |
| SHV-benzeri | - | Penisilin |
| VEB-1 | Kromozom | GSBL |
| PER-1 | - | GSBL |

(Bergogne' den, 3)

4.3.2.2 Plazmid aracılığı ile sentezlenen beta laktamazlar

Acinetobacter türlerindeki plazmid aracılı (Bkz Tablo 3) kazanılmış beta-laktamazlar TEM-1, TEM-2 ve SHV enzimleridir. Ampisilin, karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlere dirençli fakat geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemleri etkilememektedirler. Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) aktivitesi gösteren PER-1 ve VEB-1 enzimleri penisilin ve sefalosporinleri etkilemektedir (65).

4.3.3 Karbapenemleri hidrolize edebilen beta laktamazlar

Geniş spektrumlu antibiyotiklerden karbapenemler 1985 yılından günümüze çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan önemli ajanlardır. Karbapenem dirençli *Acinetobacter* türleri, giderek dünya çapında artmaktadır ve gelişen antibiyotik direnci için dikkat çekmektedir. *Acinetobacter* türleri enzimatik inaktivasyon, efluks pompası, ilacın hedef bölgesinin modifikasyonu mekanizmalarıyla karbapenemlere direnç geliştirmektedir (69). Karbapenem direnç mekanizması Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. Karbapenem direnç mekanizması

| Mekanizma | |
|--|---|
| Beta laktam hidrolizi | |
| IMP-1, -2, -4, -5, -6, -11 VIM-2, SIM-1 | Sınıf B metallo beta laktamaz, sınıf 1 integron ilişkili gen |
| OXA-23 | Sınıf D beta laktamaz. Kromozomal veya plazmid genleri ,IS elementlerinin yanında |
| OXA-24/40 | Sınıf D beta laktamaz. Kromozomal veya plazmid genleri |
| OXA-58 | Sınıf D beta laktamaz. Kromozomal veya plazmid genleri, IS elementlerinin yanında |

Tablo 4' ün devamı

| | |
|--------|---|
| OXA-51 | Kromozomal sınıf D beta laktamaz <i>A. baumannii</i> var olan direnç, eğer IS elementlerinin uzanan koluna insert olmuşsa |
|--------|---|

(Pachon' dan, 62)

Karbapenemazlar aktif bölgelerindeki hidrolitik mekanizmaya göre iki ana gruba ayrılır. MBL, gram pozitif basillerde tanımlanmış olan ve EDTA ile inhibe olmalarıyla diğer beta laktamazlardan ayrılan sınıftır. Bu enzimlerin aktif bölgelerindeki çinko iyonu bisiklik beta laktam halkasını hidrolize etmeyi kolaylaştırmaktadır. *Enterobacteriaceae* üyelerinde 1980' lerin ikinci yarısında ortaya çıkan, aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunan ve EDTA ile inhibe olmayan diğer grup serin karbapenemazlardır (70). Moleküler sınıflandırmada beta laktamazlar dört sınıfa ayrılırlar. Karbapenemazlar A, B ve D gruplarında yer almaktadır. Sınıf A, C ve D aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulundurulur (70, 71, 72, 73).

4.3.3.1 Sınıf A karbapenemazlar

Sınıf A serin karbapenemazlar 20 yıl önce ilk keşfedildiğinden bu yana fonksiyonel grup 2f' de görülürler ve klinik izolatlar arasında sporadik yayılım gösterirler. *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ve *Klebsiella* spp. türlerinde tek izolat ya da küçük salgınlar halinde görülmüştür (70).

Sınıf A karbapenemazlar kromozomal veya plazmidle kodlanırlar. Klavulanik aside duyarlıdırlar. Sınıf A da kromozomla kodlanan enzimler IMI (imipenem-hydrolysing beta-lactamase), NMC (not metalloenzyme carbapenemase) ve SME (*Serratia marcescens* enzyme) *E. cloacae* ve *S. marcescens*' de; plazmidle kodlanan KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) enzimi *Enterobacteriaceae* ve GES (Guyana ESBLs) tipi enzimlerde *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*' da tanımlanmıştır. Sınıf A karbapenemazlarından IMI, NMC, SME, KPC enzimleri karbapenem, sefalosporin, penisilin ve aztreonamı hidrolize edebilirlerken, klavulanat ve tazobaktam ile inhibe olmaktadır. Bu nedenle fonksiyonel alt grup 2fe' de yer alırlar. GSBL olarak tanımlanan GES enzimi imipenem hidrolizi zayıf olduğu için 2f grubuna dahil edilmiştir (70, 72).

4.3.3.2 Sınıf B karbapenemazlar

4.3.3.2.1 Metallo beta laktamazlar

Sınıf B karbapenemazlardan klinik anlamda büyük önem taşıyan MBL' lerdir. Gram negatif bakterilerde karbapenemaz aktivitesi ve inhibitörlere karşı dirençte, bütün beta laktam ajanlara dirençte MBL enzim aktivitesi dikkat çekmektedir (74). Klasik beta laktamaz inhibitörlerinden; klavulanat, tazobaktam, sulbaktam ile baskılanamazlar. Aktif bölgesinden bulunan çinko iyonundan dolayı EDTA, dipikolinik asit gibi metal şelatörlerle inaktivasyonu mümkündür (75, 76, 77, 78). Monobaktamlar dışında karbapenemler dahil olmak üzere tüm beta laktam ajanları hidrolize ederler (79, 80).

4.3.3.2.2 Metallo beta laktamazların sınıflandırması

Ambler tarafından 1980 yılında serin beta laktamazlar olarak kategorize edilmiş fakat fonksiyonel özelliklerine göre 1989' da Bush ileri bir sınıflamaya gitmiş ve grup 3' de kategorize edilmiştir. Bu sınıflandırmada MBL' lerin, substrat profili başta olmak üzere (imipenem hidrolizi gibi), EDTA gibi metal şelatörlere duyarlılığı ve serin beta laktamaz inhibitörlerinin inhibisyonundan etkilenmemeleri seçici kriterler olarak görülmüştür. Sınıflandırma 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir (76). İmipenem ve beta laktam ajanları hidroliz etmeleri temel alınarak MBL' ler alt gruplara ayrılmıştır. Bu sınıflamada; Grup 3a' da geniş spektrumlu enzimler, grup 3b' de özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih edenler, grup 3c' de ise diğer beta laktamlara göre karbapenemleri daha zayıf hidrolize eden enzimler bulunmaktadır. Bütün bu enzimlerin ortak özelliği EDTA ile inhibe olmalarıdır (67).

MBL' ler beta laktamazların yapısal sınıflandırmasında sınıf B' de yer alır ve üç ana yapısal alt sınıf içerir (82). Aktif bölgelerinin yapısının yanı sıra sekans farklılığına göre farklı alt sınıflar içermektedir. B1 ve B3 aktif bölgelerinde iki tane çinko iyonu bulundururken, B2 alt sınıfı bir adet çinko bulundurması alt sınıfların substrat profilinin kısıtlı olduğunu açıklamaktadır. Sınıf B1' de yer alan enzimler çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde üç histidin ve bir sistin aminoasiti içeren enzimlerdir. Bu grupta IMP, VIM, GIM ve SPM gibi transfer edilebilen enzimler bulunmaktadır. Sınıf B2' de bulunan enzimler, çinko iyonu ile birleşecekleri bölgelerinde birinci pozisyonda histidin yerine asparajin bulundurmaktadırlar. *Aeromonas* türlerinde ve *Serratia fonticola*' da bulunan SFH-1 enzimi bu gruba dahildir. Sınıf B3' de bulunan L1

enzimi ise diğerlerinden farklı olarak tetramer özelliğindedir (76). En az %30 aminoasit dizisi benzerliği yeni MBL' lerin sınıflandırılması için eşik değerdir (74, 78).

4.3.3.2.3 Kromozomal kökenli metallo beta laktamazlar

Bu enzimlerin en önemli özelliği indüklenebilir olmalarıdır. *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bacillus anthracis* dışında, bu enzimleri sentezleyen bakteriler fırsatçı patojenlerdir ve ciddi enfeksiyonlara yol açmazlar. Genellikle serin beta laktamazlarla beraber bulunurlar. Örneğin *S. maltophilia* hem L1 MBL hem de kromozomal sınıf A enzimi olan L2' yi birlikte sentezler (83). Kromozomal MBL enzimi sentezleyen bakteriler ve enzimleri Tablo 5' de verilmiştir.

Tablo 5. Kromozomal kökenli MBL sentezleyen bakteriler ve enzimleri

| Alt grup | Organizma | Enzim |
|----------------------------------|---|-----------------|
| B1 | <i>Bacillus cereus</i> | BCII-5/B/6 83 |
| | | BCII-569/H |
| | | Bla2 |
| | <i>Bacillus anthracis</i> | Bla2 |
| | | Bce 170 |
| | <i>Alkalophilic Bacillus spp.</i> | Bce 170 |
| | | |
| | <i>Chryseobacterium indologenes</i> | IND-1 |
| | | IND-2, 2a, 3, 4 |
| | <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | BlaB |
| | | BlaB2, BlaB3 |
| | | BlaB4-8 |
| | <i>Chryseobacterium gleum</i> | CGB-1 |
| | <i>Myroides odoratus</i> | TUS-1 |
| <i>Myroides odoratimimus</i> | MUS-1 | |
| <i>Flavobacterium johnsoniae</i> | JOHN-1 | |
| B2 | <i>Aeromonas hydrophilia</i> | CphA |
| | | ImiS |
| | <i>Aeromonas veronii</i> | AsbM1 |
| <i>Serratia fonticola</i> | SFH-1 | |
| B3 | <i>Caulobacter crescentus</i> | Mb11B |
| | | CAU-1 |
| | <i>Janthinobacterium lividium</i> | THIN-B |
| | <i>Legionella gormanii</i> | FEZ-1 |
| | <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | GOB-1-7 |
| | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | L1a |
| | | L1-BlaS |
| L1c, L1d, L1e | | |

(Zarrilli' den, 69)

4.3.3.2.4 Metallo beta laktamazların transferinde kullanılan genetik sistemler

MBL enzimi kodlayan genler, çeşitli integron yapıları içinde gen kasetleri olarak bulunmaktadır. Kromozomal MBL' lerin dışında çoğunlukla diğer MBL' leri kodlayan genler sınıf 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. IMP tipi MBL' lerin sınıf 3 integronlarda da bulunabildiği gösterilmiştir. Bu integronlar plazmid veya transpozonla birleştiğinde bakteriler arası transferi kolaylaşmaktadır (84).

4.3.3.2.5 Transfer edilebilen metallo beta laktamazlar

Transfer edilebilen MBL enzimleri *bla* geni vasıtasıyla kodlanır. Sınıf 1 integronların içindeki gen kasetleri ve bakteriler arasında plazmidle aktarıldığı gibi transpozonla aktarılabilmesi horizontal yayılımı kolaylaştırmaktadır (79). Bu enzimlerden en sık saptananlar IMP, VIM, SPM, GIM, SIM iken karbapenem direncinden sorumlu diğer NDM, KHM, AIM, DIM tipi MBL enzimlerinden de son yıllarda sıkça bahsedilmektedir (74).

4.3.3.2.5.1 IMP benzeri metallo beta laktamazlar

İlk kez 1988 yılında Japonya' da *P. aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir. Saptanan enzimlerin aynı aminoasit dizisine sahip olduğu belirlenmiş ve diğer beta laktam ajanlar yanında özellikle imipenemi hidrolize etmesinden dolayı enzime IMP-1 adı verilmiş ve konjugatif plazmidle taşındığı saptanmıştır. Aynı direnç geni üç yıl sonra 1991 yılında Japonya' da Okazaki' de *S. marcescens* Tn9106' da izolatında saptanmıştır. Plazmid üzerinde sınıf 3 integronla *aac(6')Ib* benzeri genlerle yan yana yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Japonya' da 1993 yılında yedi hastanede yapılan bir çalışmada dört *S. marcescens* izolatının *bla*_{IMP-1} geni taşıdığı tespit edilmiştir. Japonya'da 1992-1994 yıllarında 17 hastaneden alınan 3.700 *P. aeruginosa* izolatında yapılan hibridizasyon çalışmasında, 5 hastaneden toplam 15 kökünde *bla*_{IMP-1} pozitif bulunmuştur (76). Daha sonra 13 ayrı ülkede yapılan çalışmalarda 20' den fazla ve farklı IMP enzimi saptanmıştır. *A. baumannii*' de bunlardan üç farklı filogruba ait altı IMP varyantı: IMP-1 İtalya, Japonya ve Güney Kore' de; IMP-2 İtalya ve Japonya' da; IMP-4 Hong Kong' da; IMP-5 Portekiz' de, IMP-6 Brezilya' da ve IMP-11 Japonya' da saptanmıştır. Avustralya' da *Acinetobacter junii* türünde IMP-4 tipi saptanmıştır (85). IMP tipi enzimlerin farklılık göstermesi farklı ülkelerden izole edildiğini ve lokal yayılım gösterdiği fikrini desteklemekte iken İngiltere'de *Acinetobacter junii* ve *A.*

baumannii izolatlarında IMP-1 enziminin saptanması MBL sorununun küresel olduğunu göstermiştir (86, 87).

4.3.3.2.5.2 VIM benzeri metallo beta laktamazlar

İlk kez 1997 yılında İtalya Verona' da *P. aeruginosa* izolatında VIM-1 (Verona integron-encoded metallo beta lactamase) enzimi rapor edilmiştir. Aminoasit dizilimleri bakımından IMP enzimleriyle %30 benzerken, *B.cereus'* un BCII enzimiyle benzerliği %39' dur. *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* genleri integronların içindeki gen kasetlerinde bulunurlar. Bu gen kasetleri ile aminoglikozit direnç genlerini taşıyan gen kasetleri genellikle aynı integron içinde bir arada tespit edilmiştir. İlk kez VIM-1' in saptandığı *P. aeruginosa* klinik izolatında enzimi kodlayan genlerin kromozomal olduğu tespit edilmiştir (88). *A. xylosoxydans*, *P. putida* ve *Escherichia coli* türlerinde de *bla_{VIM-1}* geni saptanmıştır (77). Günümüzde 20' den fazla VIM varyantı olduğu bilinmektedir ve çoğu sınıf 1 integronlar tarafından kodlanmaktadır. VIM-2 en yaygın görülen varyantıdır. İlk kez 1996' da nötropenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır (89). Bu izolatın seftazidim, sefepim ve imipeneminde içinde bulunduğu pek çok antibiyotiğe dirençli ve aztreonama duyarlı olduğu belirlenmiştir. VIM-2 *A. xylosoxydans*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Enterobacter* türlerinden *Citrobacter freundii*, *S. marcescens* ve *E. cloacae'* de saptanmıştır (76). Dünyada VIM-2 beş kıtada 37 ülkede diğer MBL' lere kıyasla daha baskın olduğu bilinmektedir. VIM tipi MBL' ler; *P. putida*, *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. cloacae*, *Proteus mirabilis* ve *E. coli* izolatlarında *P. aeruginosa'* ya kıyasla daha seyrek görülmektedir.

Günümüzde VIM tipi MBL' lerin Avrupa ve Kore' de endemik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Güney-Kuzey Amerika, yakın zamanda Avustralya, Hindistan ve İran' dan da bildirilmiştir (79). *A. baumannii* için VIM-1 ve VIM-4 tipleri Yunanistan' dan; VIM-3 ve VIM-11 tipleri Tayvan' dan; VIM-2 tipleri de Kore' den bildirilmiştir (90, 91, 92, 93, 94).

4.3.3.2.5.3 SIM tipi metallo beta laktamazlar

İlk kez 2005 yılında Güney Kore' de yedi *A. baumannii* izolatında bulunmuş ve 'Seul imipenemaz' olarak adlandırılmıştır. Aminoasit dizilimi bakımından IMP tipi enzimlerle %64-69 oranında benzerdir. *bla_{SIM-1}* geni sınıf 1 integronun içerisinde

taşınan rifampin, kloramfenikol ve aminoglikozit direncinden sorumlu *arr-3*, *catB3* ve *aadA1* gen kasetleriyle birlikte bulunmuştur (95). Hindistan' da 2009 yılında *Enterobacteriaceae*; Güney Kore' de 2010 yılında *Acinetobacter genomospecies* 10 ve 2012 yılında *P. aeruginosa* izolatında tespit edildiği bildirilmiştir (96, 97, 98).

4.3.3.2.5.4 GIM-1 tipi metallo beta laktamazlar

GIM-1, Almanya' da bir tıp merkezinde 2002 yılında yatan beş farklı hastadan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında tespit edilmiş ve 'German imipenemase' olarak adlandırılmıştır. GIM-1 aminoasit dizilimi bakımından IMP tipi enzimlerle %39-40 benzerken, VIM tipi enzimlerle %40-44 , SPM ile %28 oranında benzemektedir. Antibiyotik paterni bakımından sadece Polimiksin B' ye duyarlıdır. Azlosilin, aztreonam ve serin beta laktamaz inhibitörlerini hidrolize edemezler. *bla_{GIM-1}* geni, aminoglikozit direncinden sorumlu gen kasetleriyle ve *bla_{OXA-2}* genininde olan sınıf 1 integron ile transfer edilmeyen 22kb' lık plazmid ile taşınmaktadır (99).

4.3.3.2.5.5 SPM-1 tipi metallo beta laktamazlar

Brezilya' nın Sao Paulo kentinde 1997 yılında *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Polimiksin B dışında birçok antibiyotiğe dirençlidir. Aminoasit dizilimi bakımından en çok IMP-1 (%35.5) ile benzemektedir. *bla_{SPM-1}* geni plazmidle taşınır, transpozonlar veya integronlar içerisinde yer almazlar. Bu özelliği IMP ve VIM enzimlerinden farklı ayırt edici özelliğidir (100). Brezilya' da bazı hastanelerde nazokomiyal salgınlara neden olmuştur (101). İran' da ilk kez *A. baumannii* izolatında *bla_{SPM-1}* geni 2011 yılında saptanmıştır (102).

4.3.3.2.5.6 Deneysel metallo beta laktamaz inhibitörleri

MBL enzimlerine karşı serin beta laktamazların inhibitör ve inaktivatörleri etkisizlerdir. Beta laktam/ beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarının, MBL direnci gelişen bakteriler ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılması tedavide etkili olmamaktadır. Birbirinden farklı aktif bölgeye sahip olan MBL' ler için, bütün hepsine etkili inhibitör bulunması oldukça zordur. (82, 103, 104).

EDTA, 10-phenanthroline, dipikolinik asid, 2 mercaptopropionic acid MBL' lerin inaktivatörü olarak bilinen kimyasallardır. Yapısal olarak farklı bileşikler MBL inhibitörü olarak incelenmiş ve bunlarla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bunlar

tiyoester türevleri, triflorometil alkolleri, ketonlar, tiyoller, sülfonil hidrozonlar, trisiklik doğal ürünler, süksinik asit türevleri, bifenil tetrazoller, sisteinilpeptidler, merkaptokarboksilatlar, 1- β -metilkarbapenem, sefotetan, tiyoksi-sefalosporinler ve penisilin türevleri sayılabilir. Bu bileşiklerin aktivitelerini farklı enzimler üzerinde denenmiş olduğundan karşılaştırmak zordur (82,105).

4.3.3.2.6 Metallo beta laktamazların tanısı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında GSBL' lerde olduğu gibi MBL' ler içinde fenotipik yöntemler vardır fakat duyarlılığı ve özgüllüğü belirlenip standardize edilen bir test henüz bulunmamaktadır.

MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. MBL tespitinde tarama plağı uygulamasında bakteri türü dikkate alınmalıdır. Çünkü *Enterobacteriaceae*' lerin çoğu ve bazı *Acinetobacter* türleri MBL enzimi taşıdığı halde 1–2 $\mu\text{g/ml}$ imipenem MİK değerleri ile duyarlı görünecektir. *Pseudomonas*' lar, *Enterobacteriaceae*' lerden daha yüksek karbapenem MİK değerlerine sahiptir (76).

Kombine disk testi: Plak içerisine test edilecek izolatın inokülasyonunu takiben, yerleştirilen 2 imipenem diskinden bir tanesine EDTA eklenerek inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirmenin yapıldığı testtir. EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem/ EDTA diskinin inhibisyon zonu, imipenem diski zon çapından 7 mm veya büyük olması MBL pozitif izolat olarak kabul edilmektedir.

Çift disk sinerji testi: Bu testte imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tespit ederek MBL pozitif bakteri izolatları saptamayı amaçlamaktadır. İmipenem diski ve merkezinden 10 mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilerek üzerine EDTA eklendikten sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilmektedir (106).

E-test: Bir tarafında imipenem diğer tarafında imipenem ve EDTA bulunan test stripinin; imipenem MİK değerinin EDTA' nın olduğu taraftaki MİK değerinden 8 kat yüksek ve üzerinde bir değer olması ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilir (107).

Modifiye Hodge Testi (MHT): Hodge ve arkadaşları, Hodge testini *N. gonorrhoeae*' de penisilinaz aktivitesinin gösterilmesi için kullanmışlardır. Lee ve arkadaşları ise MHT' nin MBL enzimini saptamak için geliştirmişlerdir. Bu test için imipenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 izolatu ile imipenem diski (10 µg) ve test edilecek bakteri izolatu gerekmektedir. MHA yüzeyine 0.5 McFarland' ı ayarlanmış, bir gece inkübasyona bırakılmış standart *E. coli* izolatının kültür süspansiyonunun ekimi yapılır, plak kuruyunca ortasına 10 µg imipenem diski yerleştirilir. İmipenem diskinin tam kenarından başlanıp dışa doğru doğrusal olarak imipenem dirençli izolatu ekimi yapılır. Bir gecelik inkübasyon sonrasında inhibisyon zonunun yonca yaprağı şeklinde olması MBL pozitifliği olarak kabul edilir.

Moleküler yöntemler: Fenotipik metodların sonuçlarının doğrulanması amacıyla PCR, DNA problama, klonlama ve DNA dizi analizi gibi yöntemler kullanılabilir (76).

4.3.3.3 Sınıf D karbapenemazlar

Ambler sınıf A ve C beta laktamazlarda olduğu gibi aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulunan sınıf D beta laktamazlar, oksasilinaz ya da OXA tipi beta laktamazlar olarak adlandırılırlar. Bush sınıflamasına göre fonksiyonel grup 2d' de yer alırlar (108). Sınıf D karbapenemazlar oksasilin ve kloksasilini benzopenisilinden daha hızlı hidrolize ederler. Klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi ajanlarla inhibe olmazken in vitro koşullarda sodyum klorür (NaCl) ile inhibe olurlar. İn vitro koşullarda NaCl ile inhibisyonu diğer beta laktamazlardan ayırt edici özellikleridir (109).

Sınıf D karbapenemazların birçoğu sınıf 1 integronlarla taşınırlar. Güncel çalışmalar insersiyon sekansları ve transpozonlar gibi diğer spesifik genetik yapılarla da taşınabileceğini vurgulamıştır. Sınıf D karbapenemazların birçoğu gram negatif bakterilerde kazanılmış direnç olarak tespit edilse de son çalışmalarda klinik ve çevresel patojenlerde doğal olarak bulunabildiğini de gösterilmiştir. Genetik çeşitliliğine ve beta laktam hidroliz spektrumuna göre tanımlanmış olan yaklaşık 150 varyant rapor edilmiştir. Oksasilinazların hidroliz mekanizmasındaki substratlar; karbapenemleri de içeren; dar veya geniş spektrumlu ajanlardır. Bu mekanizmalara göre oksasilinaz enzimlerinin 36' sı dar spektrumlu, 19' u GSBL, 64 tanesinde karbapenemaz olarak kabul edilmiştir.

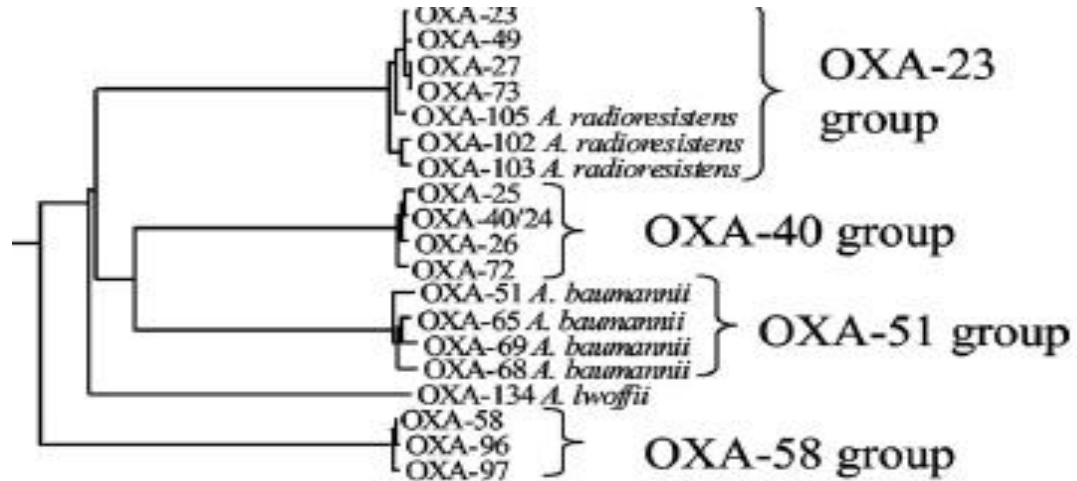
Kazanılmış, karbapenem hidrolize eden sınıf D beta laktamazlar (KHDLs) geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz edebilirler. İmipenem hidrolizi meropenem hidrolizinden daha baskındır. Bu enzimlerin birçoğunu *Acinetobacter* türleri üretmektedir (110). KHDL enzimleri sekiz alt gruptan oluşmaktadır. Her alt grubun farklı alt gruplardaki grup üyeleri ile aralarındaki benzerlik %40-70 iken, grup üyelerinin birbirleri ile olan aminoasit seviyesindeki dizi benzerlikleri %92.5 civarındadır. Bu sekiz alt grubun dördü; Avrupa, Güney Amerika, Asya, Fransa ve Polinezya' dan toplanmış *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır (111). Resim 1' de alt grupların dendogramı gösterilmektedir. KHDL enzimlerinden OXA-23, OXA-24, OXA-58 enzimleri *A. baumannii* karbapenem direnci ile ilişkili bulunmuştur (110). İlk rapor edilen alt grup 1985' de İskoçya' da *A. baumannii* klinik izolatında ARI-1 olarak tanımlanmış, DNA dizi analizi sonrası OXA-23 olarak ismi değiştirilmiştir. OXA-23 ile OXA-27, -40, -49' un sekans diziliminde ikinci aminoasidin yerine beşinci aminoasit geçmiştir (112). Singapur' da tanımlanan *bla*_{OXA-27} geninin, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatı tarafından kromozomal olarak kodlandığı düşünülmektedir. *bla*_{OXA-27} geni Fransa' da karbapenem dirençli *Proteus mirabilis* izolatında kromozomal taşındığı bildirilmiştir. OXA-23 pozitif *A. baumannii* izolatları dünya çapında Fransa, Bulgaristan, İran, Birleşik Arap Emirlikleri, Tunus, Brezilya ve Avustralya gibi ülkelere yayılmıştır. OXA-23 üreten izolatlar Fransa, Polinezya, Kolombiya, İngiltere, Türkiye, Çin ve Kore' de hastane salgınlarının kökeni olmuşlardır. OXA-23 pozitif *A. baumannii* izolatı ve *A. junii* izolatı Romanya' da identifiye edilmiştir (110).

İkinci grup OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 ve OXA-72 enzimlerinden oluşmaktadır. OXA-24/OXA-40 İspanya' da saptanan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında kromozomal kodlandığı bilinmektedir (113). *bla*_{OXA-40} geni özellikle Portekiz ve İspanya' nın farklı bölgelerinden ve Amerika' dan da bildirilmiştir. *bla*_{OXA-40} geni kromozomal ya da plazmid aracılığı ile aktarılabilir. İspanya' da karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında plazmidle aktarıldığı gösterilmiştir (110). OXA-40 enzimi NaCl ile inhibe olmamaktadır (114). OXA-40 enziminin nokta mutasyonlu türevleri; OXA-25 ve OXA-26 enzimleri ise İspanya ve Belçika' da karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. OXA-72 *A. baumannii* izolatlarında Çin, Güney Kore, Tayvan, Bahreyn' de varlığı saptanmıştır (110).

Üçüncü grup OXA-58, ilk Fransa' da çoğul dirençli *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. OXA-58 penisilin ve karbapenem hidrolizi düşük seviyededir (115). Avrupa, Arjantin, Avustralya ve Amerika olmak üzere dünyada pek çok ülkede *bla*_{OXA-58} geninin plazmid kaynaklı olduğu bulunmuştur. Fransa, Belçika, İtalya, Türkiye, Yunanistan ve Amerika' da birçok hastane salgınından izole edilmiştir. *A. junii* Romanya' da ve Avustralya' da; *Acinetobacter* genomspecies 3 ve *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU İspanya' da OXA-58 enzimi ürettiği bilinmektedir. OXA-58' in nokta mutasyonu ile oluşan varyantı OXA-96 ve plazmid kaynaklı OXA-97 aynı hidroliz mekanizmasına sahiptir.

OXA-143 *A. baumannii* izolatında Brazilya' da yeni tanımlanmıştır. OXA-40 ile %88, OXA-23 ile %63, OXA-58 ile %52 aminoasit benzerliği vardır (110).

A. baumannii AYE izolatının tüm genomunun sekans analizinden sonra OXA-51' in ve OXA-69' un kromozomal olarak kodlandığı doğrulanmıştır. *A. baumannii* izolatlarında OXA-69, OXA-62 ile aminoasit benzerliği %56; OXA-51 ile aminoasit benzerliği %97 olarak bulunmuştur. *A. baumannii* izolatlarının OXA-51 (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82 ve -143) varyantları dünya genelinde yayılmıştır. Bu türevlerin bazıları karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır (110, 111, 116).



Resim 1. *A. baumannii* için OXA enzim alt grupları

(Poirel' den, 110)

4.3.3.3.1 Sınıf D karbapenemazların tanısı

Sınıf D karbapenemazların hızlı tanısı için klinik mikrobiyoloji laboratuvarında standardize edilen fenotipik testler henüz bulunmamaktadır. Bazı özel laboratuvarlarda spektrofotometrik analizler ile oksasilin hidrolizi değerlendirilmektedir. Genotipik yöntemlerden PCR, oksasilinaz identifikasyonu için altın standart olarak kabul edilmiştir (110).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Çalışma grubu

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı' na Ocak 2007-Aralık 2009 tarihleri arasında kan kültürlerinde ABC izole edilen, imipenem veya meropenem orta dirençli ve dirençli 74 hastanın 74 kan izolatu çalışmaya dahil edildi. Her hastadan ilk izole edilen ABC izolatu çalışılmıştır. Bakteri izolatlarının kodları, hastanın hastaneye yatış ve hastadan izole edildiği tarihler ve materyalin gönderildiği birim Tablo 6' da gösterilmiştir.

Tablo 6. İzolat kodu, izolasyon tarihi ve materyalin gönderildiği birim

| İzolatu Kodu* | Yatış Tarihi | İzolasyon Tarihi | Materyalin Gönderildiği Birim |
|---------------|--------------|------------------|---------------------------------|
| AB001 | 25.12.2007 | 10.01.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB002 | 31.12.2007 | 05.02.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB003 | 12.01.2008 | 22.02.2008 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB004 | 02.02.2008 | 02.03.2008 | Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB005 | 27.02.2008 | 12.03.2008 | Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB006 | 20.02.2008 | 30.03.2008 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB007 | 04.03.2008 | 02.04.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB008 | 05.11.2007 | 22.04.2008 | Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB009 | 04.04.2008 | 28.04.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB010 | 02.04.2008 | 26.05.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB011 | 31.05.2008 | 15.06.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB012 | 07.06.2008 | 20.06.2008 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB013 | 05.04.2008 | 07.09.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB014 | 09.06.2008 | 25.06.2008 | Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB015 | 08.05.2008 | 29.06.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB016 | 28.06.2008 | 06.07.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB017 | 15.06.2008 | 09.07.2008 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB018 | 10.07.2008 | 22.07.2008 | Dahiliye Servisi-1 |
| AB019 | 14.07.2008 | 29.07.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB020 | 28.07.2008 | 05.08.2008 | Dahiliye Servisi-1 |
| AB021 | 23.08.2008 | 25.09.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB022 | 16.10.2008 | 03.11.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |

| İzolot Kodu* | Yatış Tarihi | İzolasyon Tarihi | Materyalin Gönderildiği Birim |
|--------------|--------------|------------------|--|
| AB023 | 27.10.2008 | 10.11.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB024 | 21.09.2008 | 24.10.2008 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB025 | 16.09.2008 | 29.10.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB026 | 29.10.2008 | 16.11.2008 | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| AB027 | 14.10.2008 | 21.11.2008 | Genel Cerrahi Servisi |
| AB028 | 05.11.2008 | 01.12.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB029 | 09.11.2008 | 25.12.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB030 | 04.12.2008 | 29.12.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB031 | 28.11.2008 | 09.12.2008 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB032 | 04.12.2008 | 04.01.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB033 | 17.12.2008 | 20.01.2009 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB034 | | 29.01.2009 | Acil Poliklinik |
| AB035 | 13.02.2009 | 20.02.2009 | Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB036 | 19.02.2009 | 18.03.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB037 | 01.12.2008 | 17.03.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB038 | 17.03.2009 | 27.03.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB039 | 06.03.2009 | 06.04.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB040 | 25.03.2009 | 06.04.2009 | Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB041 | 06.04.2009 | 08.04.2009 | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| AB042 | 21.04.2009 | 25.04.2009 | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| AB043 | 28.03.2009 | 15.04.2009 | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| AB044 | 22.04.2009 | 05.05.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB045 | 13.04.2009 | 13.05.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB046 | 14.05.2009 | 21.05.2009 | Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB047 | 03.05.2009 | 19.05.2009 | Dahiliye Onkoloji Servisi |
| AB048 | 30.04.2009 | 05.06.2009 | Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB049 | 08.06.2009 | 24.06.2009 | Kalp Damar Cerrahisi Servisi |
| AB050 | 13.07.2009 | 13.07.2009 | Dahiliye Servisi-2 |
| AB051 | 06.07.2009 | 13.07.2009 | Kalp Damar Cerrahisi Servisi |
| AB052 | 10.07.2009 | 28.07.2009 | Kalp Damar Cerrahisi Servisi |
| AB053 | 18.07.2009 | 21.07.2009 | Kalp Damar Cerrahisi |
| AB054 | 22.07.2009 | 28.07.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB055 | 26.05.2009 | 25.07.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |

| Izolot Kodu* | Yatış Tarihi | İzolasyon Tarihi | Materyalin Gönderildiği i Birim |
|--------------|--------------|------------------|---|
| AB057 | 28.08.2009 | 06.09.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB058 | 01.09.2009 | 11.09.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB059 | 11.09.2009 | 14.09.2009 | Dahiliye Servisi-2 |
| AB060 | 25.09.2009 | 10.10.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB061 | | 06.10.2009 | Beyin Cerrahisi Polikliniği |
| AB062 | 15.10.2009 | 20.10.2009 | Dahiliye Servisi-2 |
| AB063 | 06.11.2009 | 13.11.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB064 | 15.11.2009 | 26.11.209 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB065 | 18.11.2009 | 01.12.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB066 | 24.11.2009 | 27.11.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB067 | 18.11.2009 | 01.12.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB068 | 08.12.2009 | 09.12.2009 | Pediatrici, Hematoloji-Onkoloji Servisi |
| AB069 | 25.11.2009 | 21.12.2009 | Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB070 | 02.12.2009 | 18.12.2009 | Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB071 | 16.12.2009 | 23.12.2009 | Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB072 | 17.12.2009 | 24.12.2009 | Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB073 | 14.12.2009 | 24.12.2009 | Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi |
| AB074 | 22.12.2009 | 29.12.2009 | Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi |

5.1.2 Araç ve gereçler

1.5 ml' lik santrifüj tüpleri, 0.2 ml' lik PCR tüpleri (Grainer bio-one, Almanya), pipet ucu (10 µl, 100 µl, 1000 µl) gibi sarf malzemeler kullanıldı. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' na ait; 37°C' lik etüv (Memmert BM 600, Almanya), biyogüvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, Teknomar, Ankara), bunsen beki, -20°C (BEKO D7210 SMF, Türkiye) ve -80°C soğutucu (New Brunswic Scientific Mod U570 premium, Thermo, USA), +4°C buzdolabı (Arçelik, 2008), pastör fırını (Heraeus T550, Portekiz), dikey model otoklav (Kermanlar, İstanbul), PhoenixTM 100 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazı, CrystalSpecTM nephelometer (USA), otomatik pipetler (Lab-mate, İngiltere), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı

(Stuart, İstanbul), vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Thermo, USA), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), mikrodalga fırın (Beko 1550, Türkiye), termal döngü cihazı (Techne, TC 512, USA), elektroforez tankı (Owl), dijital güç kaynağı (EC-105), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad, İstanbul), UV illüminatör (Wilber lourtmat, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, İstanbul) ve distile su cihazı (GFL, Ankara) gibi cihazlar kullanıldı. Cam biyokimya tüpleri, 250 ml' lik erlenmayer, 50 ml' lik mezür, cam balon joje, 50 ml' lik ve 15 ml' lik falkon tüpler, kaynatma kabı, jel dökme tepsisi ve tarak kullanıldı.

5.1.3 Kimyasallar

Sodium chloride (NaCl) (Merck, Almanya), Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon, AST indikatörü, Bacto Tryptone, Sodium hydroxid (NaOH) (Merck, Almanya), Yeast Extract (Oxoid, UK), Luria Bertani (LB) Broth (Oxoid, UK), Tryptose Blood Agar (Merck, Almanya), Agaroz (HIMEDIA, Hindistan), Etidyum bromür (Merck, Almanya), Bromphenol blue (BioRad, USA), Xylene cyanol (Sigma, Almanya), Tris HCl (Sigma, Almanya), EDTA (Sigma, Almanya), Glycerol (Merck, Almanya), double distile water (ddw), Amplifikasyon seti (Promega, Amerika), dNTP seti (Roche, Almanya, Fermentas, ABD), Primerler (IDT, Amerika,biomers, Almanya), 100 bp DNA marker (Biolabs, New England) kullanıldı.

5.1.4 Besiyerleri

Mueller Hinton Agar Besiyeri:

38 g Mueller Hinton Agar Besiyeri 1000 ml distile suda eritildi ve 1 atm basınç ve 121°C' de 15 dk otoklavlandı. 55°C' ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülerek donduruldu. Bu besiyeri kombine disk testi ve modifiye Hodge testi uygulamaları için kullanıldı.

5.1.5 Solüsyonlar

5.1.5.1 DNA İzolasyonu için kullanılan solüsyonlar

Tris HCl (1 M):

Beher içerisine; 80 ml distile su konulup üzerine 15.7 gr Tris HCl eklendi. Solüsyon berraklaştığında pH metre ile pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim mezür aracılığı ile 100 ml' ye tamamlandı. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavlanarak steril edildi.

EDTA (0.5 M):

Beher içerisine; 29.2 g EDTA (MW:292.2) distile su ile 200 ml' ye tamamlandı. Solüsyon berraklaştığında pH metre ile pH 8.0 olana kadar NaOH peleti ilave edildi. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavda steril edildi.

TE tamponu:

Beher içerisine; son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1ml, EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98.8 ml steril distile su eklendi.

5.1.5.2. Master mix için kullanılan solüsyonlar

dNTP mix:

1.5 ml' lik santrifüj tüplerine 100 mM' lık dTTP, dATP, dGTP, dCTP' in her birinden 40 µl koyuldu ve her birinin üzerine 680 µl steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir süre vortekslendi. Böylece 5.0 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım 200 µl olarak yeni, steril, mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

Primer mix:

Liyofilize haldeki primerler stok konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde steril distile suyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edildi. Her bir primer çifti için; 1.5

ml' lik santrifüj tüplerine stok çözeltilerden her biri için 20 µl koyuldu ve üzerine 360 µl steril distile su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/µl olan primer mix hazırlandı. Kullanılincaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

5.1.5.3 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan solüsyonlar

5X TBE tamponu:

Beher içerisine 54 gr Tris Base, 27.5 gr Boric Acid, 3.72 gr EDTA yaklaşık 700 ml distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülüp berraklaştıktan sonra hacmi 1000 ml' ye tamamlandı ve pH metre ile pH 8.3' e ayarlandı.

Yükleme Tamponu:

Beher içerisinde 30 ml gliserol, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol distile su içinde karıştırıldı ve hacim 100 ml' ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5 ml' lik santrifüj tüplerine 1 ml olarak dağıtıldı ve kullanılincaya kadar -20°C' de saklandı.

Etidyum Bromür:

50 mg Etidyum bromür 10 ml distile su ile son konsantrasyonu 5 mg/ml olmak üzere manyetik çalkalayıcı üzerinde karıştırılarak homojen olarak çözünmesi sağlandı. Koyu renkli cam şişeye konuldu. Oda ısısında muhafaza edildi.

5.2 Yöntem

5.2.1 İzolatların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) ve EMB agara (Oxoid, England) inokule edilerek 35± 2°C' de bir gece inkübe edildi.

1. Üreyen mikroorganizmalar klasik yöntemlere ilaveten, Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazı üretici firma önerileri doğrultusunda Phoenix ID/AST otomotize mikrobiyoloji sisteminde tür düzeyinde tanımlandı ve antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışıldı.

2. *Acinetobacter* olduğundan şüphelenilen oksidaz negatif, nonfermentatif, gram negatif kokobasillere ait kolonilerden CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA) kullanılarak ID buyyon içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı.
3. Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon tüpüne, bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde, 25 µl bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra AST buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı.
4. Hazırlanan paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir okuma yapan Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazına yerleştirildi (117, 118).
5. *Acinetobacter* olarak tiplendirilen şuşlar DNA izolasyonu yapılmaya kadar %15 gliserol (Riedel-de Haën AG, Germany) içeren triptik soy buyyon besiyerinde (Fluca, 22092) -70 °C' de saklandı. .
6. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sistemine ilaveten Kirby-Bauer metoduna göre, Mueller Hinton Agar (MHA) kullanılarak standart disk diffüzyon metodu ile de araştırıldı (119). Duyarlılık testlerinin sonuçları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (118, 120).

5.2.2 Metallo beta laktamazların fenotipik olarak tanımlanması

5.2.2.1 İmipenem/ imipenem-EDTA içeren kombine disk testi

Amaç: Kombine disk testinin mekanizması, EDTA varlığında ölçülen imipenem inhibisyon zon çapının elde edilen imipenem inhibisyon zon çapından 7mm ya da daha fazla olması temeline dayanmaktadır.

1. ABC izolatlarının taze kültürlerinden, serum fizyolojik içeren cam tüplerin içerisine 0.5 Mc Farland bulanıklığında, test edilecek bakteri süspansiyonu hazırlanarak MHA' ya steril eküvyon çubuk yardımıyla bakterinin homojen inokülasyonu yapıldı.

2. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben aralarında en az 22 mm olacak şekilde iki imipenem diski (10µg) besiyeri yüzeyine steril pens yardımıyla yerleştirilerek, imipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10µl EDTA (0.5M, pH 8) eklendi.
3. Plaklar 35±2°C' de 18 saat inkübe edildi.
4. İmipenem+EDTA için ölçülen inhibisyon zon çapı, imipenem için ölçülen inhibisyon zon çapından 7 mm daha geniş ise test sonucu pozitif olarak kabul edildi.
5. Testin kalite kontrolü, daha önceki testlerde kullanılan MBL pozitif ve MBL negatif izolatlarla yapıldı (121).

5.2.2.2 Modifiye Hodge test

Amaç: Modifiye Hodge Test MBL enziminin EDTA varlığında inhibe olması prensibine dayanmamaktadır. MHT, meropeneme duyarlı bir bakteri izolatının, MBL üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu meropenem varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır.

Bu testte *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 meropeneme duyarlı bakteri izolatı olarak kullanıldı. Test edilecek tüm izolatlar için *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatları ile MHT yapıldı. MHT uygulanmadan önce kullanılacak olan *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatının meropeneme duyarlı olduğu disk difüzyon yöntemiyle doğrulandı.

1. *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatlarının kanlı agardaki taze kültüründen, 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu yapılarak, bakteri süspansiyonunun 1:10 sulandırımı yapıldı ve steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı.
2. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben besiyerinin merkezine meropenem diski (10µg) yerleştirildi.
3. Test edilecek ABC izolatının kanlı agardaki taze kültüründen steril eküvyon yardımıyla 1-2 bakteri kolonisi toplandı ve meropenem diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru yoğun bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif kontrol (*K. pneumoniae* BAA 1705), biri negatif kontrol (*K. pneumoniae* BAA 1706) olmak üzere toplam dört izolat çalışılmış oldu.
4. İnokülasyonu takiben plaklar 35°C' de 18 saat inkübe edildi.

5. *E. coli* standart izolatına ve *K. pneumoniae* standart izolatına bağılı oluşan inhibisyon zonunun ABC üremesinin bulunduğı bölgede azalması ve bu bölgede *E. coli* ya da *K. pneumoniae* üremesinin görölmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi (122, 123, 124).

5.2.3 DNA izolasyonu

Kaynatma metodu ile hücre duvarı ve membranı parçalanarak, DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Tür düzeyinde tanımlanan ve -80 °C' de saklanan bakteri izolatları %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) besiyerine inokule edildi. Aerobik koşullarda 35±2°C' de 20-24 saat inkübe edildi.
2. Üreyen kolonilerin saflığından emin olunarak 3 ml LB sıvı besiyerine tek koloni pasajı yapıldı.
3. 37°C' ye ayarlanmış çalkalayıcı su banyosunda 200 rpm' de bir gece inkübe edildi.
4. Kültürün 1.5 ml' si steril eppendorf (1.5 ml) tüplere transfer edilerek mikrosantrifüjde 5000 rpm' de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.
5. Süpernatant kısmı döküldü ve pelletin üzerine 1 ml TE tamponu eklenip vortekslendi. Tekrar 5000 rpm' de 5 dk çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant kısmı atılıp pelletin üzerine 1 ml ddw eklenip vortekslendi.
6. Santrifüj işlemi aynı koşullarda bir kez daha tekrarlanıp süpernatant kısmı döküldükten sonra pelletin üzerine 500 µl deiyonize su eklendi ve bakteri süspansiyonu 95°C' de 10 dk kaynatıldı.
7. Kaynatma işleminin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant kısmından 400 µl alınıp steril 1.5 ml' lik PCR tüplerine koyuldu. İzole edilen DNA, çalışma için kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

5.2.4 Master mix hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. PCR için master mix bileşenleri ve miktarları

| Bileşenler | Stok Konsantrasyonu | Miktar (μ l) 1x |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| Buffer | 5X | 10 |
| dNTP mix | 2.5 mM | 1 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 5 |
| Primer 1 | 5 pmol | 1.5 |
| Primer 2 | 5 pmol | 1.5 |
| Taq polimeraz | 5 U/ μ l | 0.3 |
| ddw | | 25.7 |
| Template | | 5 |
| Toplam reaksiyon hacmi | | 50 |

Master mix hazırlarken bütün aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Buz üzerine steril 1.5 ml santrifüj tüpü yerleştirildi. Tablo 7' de gösterilen kimyasallar -20°C dondurucudan çıkartıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar 5-10 sn vortekslendikten sonra Tablo 7' de belirtilen sıraya göre pipet aracılığı ile karıştırıldı. Taq polimeraz kullanılmadan önce kısa bir santrifüj edildi ve yukarı aşağı pipetleyerek tüpe aktarıldı. Steril deiyonize su konulduktan sonra tüp 30 sn vortekslenerek master mix karıştırıldı. Bu işlemler sonunda master mix hazırlanmış oldu. Hazırlanan master mix 0.2 ml' lik PCR tüplerine 45 μ l olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına göre izole edilen DNA her bir tüpe 5' er μ l pipet ile aktarıldı. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak MBL geni bulundurduğu bilinen *P. aeruginosa* izolatından izole edilen DNA 5 μ l eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.

5.2.5 Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR için kan örneklerinden izole edilen ABC izolatlarının kaynatma metodu ile elde edilen DNA kullanıldı.

5.2.5.1 Metallo beta laktamaz varlığını araştırmak için kullanılan primerler

MBL enzimi kodlayan gen bölgelerini amplifiye etmek için , *bla*_{IMP} geni için bir, *bla*_{IMP-1} geni için bir, *bla*_{IMP-2} geni için bir, *bla*_{VIM} geni için bir, *bla*_{VIM-1} geni için bir, *bla*_{VIM-2} geni için bir *bla*_{SIM} geni için bir, *bla*_{GIM} geni için bir, *bla*_{SPM} geni için bir primer seti kullanıldı. İzole edilmiş -20°C’ de muhafaza edilen DNA, PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Her test iki defa tekrarlandı. Çalışılan primer setlerinin dizileri Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. MBL enzim direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler

| Primer | Sekans (5’-3’) | Ürün uzunluğu (bp) | Referans |
|------------|-----------------------------------|--------------------|----------|
| IMP gen F1 | GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC | 188 | 125 |
| IMP gen R1 | CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC | | |
| VIM gen F2 | GTTTGGTCGCATATCGCAAC | 382 | 125 |
| VIM gen R2 | AATGCGCAGCACCAGGATAG | | |
| IMP-1 F | TGAGCAAGTTATCTGTATTC | 740 | 126 |
| IMP-1 R | TTAGTTGCTTGGTTTTGATG | | |
| IMP-2 F | GGCAGTCGCCCTAAAACAAA | 737 | 126 |
| IMP-2 R | TAGTTACTTGGCTGTGATGG | | |
| VIM-1 F | TTATGGAGCAGCAACGATGT | 920 | 126 |
| VIM-1 R | CAAAAGTCCCGCTCCAACGA | | |
| VIM-2 F | AAAGTTATGCCGCACTCACC | 865 | 126 |
| VIM-2 R | TGCAACTTCATGTTATGCCG | | |
| SIM-1-F | TACAAGGGATTTCGGCATCG | 570 | 88 |
| SIM-1-R | TAATGGCCTGTTCCCATGTG | | |
| SPM-1-F | CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG | 798 | 125 |
| SPM-1-R | CCTTTTCCGCGACCTTGATC | | |
| GIM-1-F | TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC | 72 | 125 |
| GIM-1-R | CGGAACGACCATTTGAATGG | | |

5.2.5.2 OXA varlığını araştırmak için kullanılan primerler

OXA enzimi kodlayan gen bölgelerini amplifiye etmek için; *bla*_{OXA-23like} geni için bir, *bla*_{OXA-24like} geni için bir, *bla*_{OXA-51like} geni için bir, *bla*_{OXA-58like} geni için

primer seti kullanıldı. İzole edilmiş -20°C’ de muhafaza edilen kromozomal DNA, PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Her test iki defa tekrarlandı. Çalışılan primer setlerinin dizileri Tablo 9’ da verilmiştir.

Tablo 9. OXA enzim direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler

| Primer | Sekans (5’-3’) | Ürün uzunluğu (bp) | Referans |
|---------------|----------------------|--------------------|----------|
| OXA 23-like F | GATCGGATTGGAGAACCAGA | 501 | 127 |
| OXA 23-like R | ATTTCTGACCGCATTTCAT | | |
| OXA 24-like F | GGTTAGTTGGCCCCCTAAA | 246 | 127 |
| OXA 24-like R | AGTTGAGCGAAAAGGGGATT | | |
| OXA 51-like F | TAATGCTTTGATCGGCCTTG | 353 | 127 |
| OXA 51-like R | TGGATTGCACTTCATCTTGG | | |
| OXA 58-like F | AAGTATTGGGGCTTGTGCTG | 599 | 127 |
| OXA 58-like R | CCCCTCTGCGCTCTACATAC | | |

5.2.6 PCR ile amplifikasyon

5.2.6.1. *bla*_{IMP} geninin amplifikasyonu

*bla*_{IMP} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 188 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan IMP-F ve IMP-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{IMP} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7’ de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C’ de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’ de 1 dakika denatürasyon, 55°C’ de 1 dakika primer birleşmesi, 72°C’ de 1 dakika uzama işlemlerinden oluşan 39 döngü uygulandı. Son olarak 72°C’ de 5 dakika uzama süresi eklendi.

5.2.6.2 *bla*_{VIM} geninin amplifikasyonu

*bla*_{VIM} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 382 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan VIM-F ve VIM-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{VIM} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7’ de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına

konularak 96°C’ de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’ de 1 dakika denatürasyon, 59°C’ de 1 dakika primer birleşmesi, 72°C’ de 1 dakika uzama işlemlerinden oluşan 30 döngü uygulandı. Son olarak 72°C’ de 10 dakika uzama süresi eklendi.

5.2.6.3 *bla*_{IMP-1} ve *bla*_{IMP-2} genlerinin amplifikasyonu

*bla*_{IMP-1} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 740 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan IMP-1-F ve IMP-1-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). *bla*_{IMP-2} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 737 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan IMP-2-F ve IMP-2-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{IMP-1} ve *bla*_{IMP-2} genlerinin varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7’ de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C’ de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’ de 1 dakika denatürasyon, 55°C’ de 1 dakika primer birleşmesi, 72°C’ de 1 dakika uzama işlemlerinden oluşan 40 döngü uygulandı. Son olarak 72°C’ de 5 dakika uzama süresi eklendi.

5.2.6.4 *bla*_{VIM-1} ve *bla*_{VIM-2} genlerinin amplifikasyonu

*bla*_{VIM-1} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 920 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan VIM-1-F ve VIM-1-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). *bla*_{VIM-2} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 865 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan VIM-2-F ve VIM-2-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{VIM-1} ve *bla*_{VIM-2} genlerinin varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7’ de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C’da 3 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’ de 1 dakika denatürasyon, 55°C’ de 1 dakika primer birleşmesi, 72°C’ de 2 dakika uzama işlemlerinden oluşan 35 döngü uygulandı. Son olarak 72°C’ de 7 dakika uzama süresi eklendi (126).

5.2.6.5 *bla*_{SIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} genlerinin amplifikasyonu

*bla*_{SIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} genlerinin varlığını PCR ile göstermek için bu genlere ait sırasıyla 570 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan SIM-1-F ve SIM-1-R primerleri, 798 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan SPM-1-F ve SPM-1-R primerleri, 72 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan GIM-1-F ve GIM-1-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 8). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{SIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} genleri varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7' de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C' de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C' de 20 saniye denatürasyon, 53°C' de 45 saniye primer birleşmesi, 72°C' de 30 saniye uzama işlemlerinden oluşan 35 döngü uygulandı. Son olarak 72°C' de 7 dakika uzama süresi eklendi (125).

5.2.6.6 *bla*_{OXA23-like}, *bla*_{OXA 24-like}, *bla*_{OXA 51-like}, *bla*_{OXA 58-like} genlerinin amplifikasyonu

*bla*_{OXA23-like}, *bla*_{OXA 24-like}, *bla*_{OXA 51-like}, *bla*_{OXA 58-like} genlerinin varlığını PCR ile göstermek için bu genlere ait sırayla 501 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-23-like-F ve OXA-23-like-R primerleri, 246 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-24-like-F ve OXA-24-like-R primerleri, 353 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-51like-F ve OXA-51-like-R primerleri, 599 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-58-like-F ve OXA-58-like-R primerleri kullanıldı (Bkz Tablo 9). DNA izolasyonu yapılan toplam 74 örnek *bla*_{OXA 23-like}, *bla*_{OXA 24-like}, *bla*_{OXA 51-like}, *bla*_{OXA 58-like} genleri varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 7' de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C' de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C' de 25 saniye denatürasyon, 53°C' de 40 saniye primer birleşmesi, 72°C' de 50 saniye uzama işlemlerinden oluşan 30 döngü uygulandı. Son olarak 72°C' de 6 dakika uzama süresi eklendi (127).

5.2.7 Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme

Jelin hazırlanması:

1 gr agaroz 50 ml TBE tamponu ile karıştırılıp mikrodalga fırında agaroz partikülleri tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C' ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra içine son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Elektroforez için %2' lik agaroz jel hazırlandı.

Yükleme:

Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu. Jel tepsiye döküldükten sonra katılaşması için oda ısısına bırakıldı. Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra tepsi ile birlikte yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA ağırlaştırılarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µl PCR ürünü 3 µl yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Örnekler ilk 10 dk 80 voltta yürütüldükten sonra 100 volta çıkarılıp 30 dk daha yürütüldü. Oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi. Jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekildi.

5.2.8 DNA dizi analizi

Çalışmamızda amplifikasyon reaksiyonu sonucunda OXA 23, OXA 51 ve OXA 58 genleri için kullanılan primerler ile istenilen büyüklükte ürün veren bir ABC izolatının DNA dizi analizi KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda bulunan Applied Biosystems 3130 DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirilmiştir. Dizi analizinden önce üretici firmanın protokolü doğrultusunda NucleoSpin[®] Extract II Kiti (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Almanya) ile PCR ürünleri temizlendi. Temizlenen ürünler daha önce yöntemde (Bkz. 5.2.7) bahsedildiği gibi agaroz jelde yürütüldü. Örnekler ABI Prism Big Dye[™] Terminatör Reaksiyon Kiti ile döngü sekansı için hazırlanıp termal döngü cihazına yerleştirildi. 94°C' de 1 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 96°C' de 15 saniye denatürasyon, 50°C' de 40 saniye primer birleşmesi, 60°C' de 50 saniye uzama işlemlerinden oluşan 25 döngü uygulandı.

Sekans reaksiyonundan sonra, floresan ile işaretli ddNTP' leri ortamdan yok etmek için Sephadex kullanıldı. Temizlenmiş sekans ürünü dizi analizi cihazına yerleştirildi.

Kromotogram dosyaları ile alınan sonuçlar ChromasPro programı ile diziler çıkartılmış, gelen dizilerin DNA dizi veritabanları ile BLAST yazılımında karşılaştırmaları yapılmıştır.

6. BULGULAR

6.1 Araştırmaya dahil edilen izolatların genel özellikleri

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakterioloji Birimi' e Ocak 2007 ile Aralık 2009 tarihleri arasında gönderilen 158 hastanın kan örneklerinden izole edilen ABC izolatlarından imipenem ya da meropenemden birine; orta duyarlı ve dirençli saptanmış olan izolatlarda karbapenemaz varlığının araştırılması planlanmıştır. Her bir hastadan, ilk izole edilen olmak kaydıyla toplam 78 ABC izolatı çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya 2007 yılına ait bir izolat, 2008 yılına ait iki izolat, 2009 yılına ait bir izolat çeşitli nedenlerden dolayı çalışma dışı bırakılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda toplam 74 ABC izolatı yer almıştır. Bu izolatların gönderildikleri birimlere göre dağılımı Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. ABC izolatlarının gönderildikleri birimlere göre dağılımı

| Birim | 2008 | 2009 | Toplam | % |
|--|-----------|-----------|-----------|------------|
| Acil Poliklinik | 0 | 1 | 1 | 1.35 |
| Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi | 0 | 7 | 7 | 9.46 |
| Beyin Cerrahisi Polikliniği | 0 | 1 | 1 | 1.35 |
| Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi | 18 | 4 | 22 | 29.73 |
| Dahiliye-Onkoloji Servisi | 0 | 1 | 1 | 1.35 |
| Dahiliye-Yoğun Bakım Ünitesi | 0 | 9 | 9 | 12.16 |
| Dahiliye Servisi | 2 | 3 | 5 | 6.76 |
| Genel Cerrahi Servisi | 1 | 0 | 1 | 1.35 |
| Göğüs Hastalıkları Servisi | 1 | 2 | 3 | 4.05 |
| Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi | 0 | 6 | 6 | 8.11 |
| Kalp Damar Cerrahi Servisi | 0 | 4 | 4 | 5.41 |
| Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi | 3 | 2 | 5 | 6.76 |
| Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi | 5 | 2 | 7 | 9.46 |
| Pediyatri, Hematoloji-Onkoloji Servisi | 0 | 1 | 1 | 1.35 |
| Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi | 1 | 0 | 1 | 1.35 |
| TOPLAM | 31 | 43 | 74 | 100 |

ABC izolatlarının %77.03' ü YBÜ' den, %20' si servislerden, %2.7' si polikliniklerden izole edildi.

6.2 İzolatların antibiyotik duyarlılıkları

Klinik kan örneklerinden izole edilen ABC izolatlarının 11 antibakteriyal ajan için duyarlılık testleri çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatların izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 11' de dir.

Tablo 11. Karbapenem orta duyarlı ve dirençli 74 ABC izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

| İzolat Kodu | SAM | TZP | CAZ | IPM | MEM | GM | CIP | LVX | SXT | AK | CTX | FEP |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| AB001 | S | R | R | I | S | R | R | R | R | S | R | R |
| AB002 | S | R | R | R | I | R | R | R | R | I | R | R |
| AB003 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB004 | R | R | R | R | S | R | R | I | R | R | R | I |
| AB005 | S | R | R | I | S | R | R | I | S | R | R | I |
| AB006 | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | R |
| AB007 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB008 | I | R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB009 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB010 | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I |
| AB011 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB012 | S | R | R | I | S | R | R | R | R | S | R | R |
| AB013 | S | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB014 | S | R | R | S | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB015 | I | R | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R |
| AB016 | R | R | R | S | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB017 | I | R | R | I | S | R | R | R | R | S | R | R |
| AB018 | R | R | R | I | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB019 | I | R | R | S | I | R | S | I | R | R | R | R |
| AB020 | R | R | R | R | I | R | R | R | R | S | R | R |
| AB021 | R | R | R | R | I | R | S | S | R | R | R | I |
| AB022 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB023 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB024 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB025 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB026 | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R |
| AB027 | I | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | I |
| AB028 | I | R | R | R | I | R | S | S | R | R | R | R |
| AB029 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB030 | S | R | R | I | I | R | R | R | R | R | R | R |
| AB031 | I | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB032 | S | R | R | I | I | R | R | R | R | R | R | R |
| AB033 | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R |
| AB034 | S | R | R | R | I | R | R | R | R | S | R | R |
| AB035 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB036 | I | R | R | R | R | S | R | I | R | R | R | R |
| AB037 | I | R | R | R | R | S | I | I | R | R | R | R |
| AB038 | R | R | R | R | R | S | R | I | R | R | R | R |

| İzolat Kodu | SAM | TZP | CAZ | IPM | MEM | GM | CIP | LVX | SXT | AK | CTX | FEP |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| AB039 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | I | R | R |
| AB040 | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | R | I |
| AB041 | R | R | R | R | R | S | I | I | R | I | R | R |
| AB042 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | I | R | I |
| AB043 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I |
| AB044 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | S | R | I |
| AB045 | I | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB046 | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R |
| AB047 | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I |
| AB048 | S | R | R | R | R | S | I | I | R | I | R | R |
| AB049 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | S | R | R |
| AB050 | S | R | R | R | R | R | R | I | R | S | R | R |
| AB051 | R | R | R | R | I | R | R | R | R | S | R | R |
| AB052 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB053 | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB054 | R | R | R | R | I | R | R | R | R | S | R | R |
| AB055 | R | R | R | R | R | R | R | I | R | I | R | R |
| AB056 | S | R | R | I | R | R | R | I | R | S | R | R |
| AB057 | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R |
| AB058 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB059 | R | R | R | I | R | R | R | I | R | I | R | R |
| AB060 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB061 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB062 | R | R | R | R | R | I | R | I | R | I | R | R |
| AB063 | R | R | R | R | R | S | R | I | R | R | R | R |
| AB064 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R |
| AB065 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R |
| AB066 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | S | R | I |
| AB067 | R | R | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R |
| AB068 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB069 | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R |
| AB070 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB071 | S | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R |
| AB072 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB073 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| AB074 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |

SAM: Ampisilin/sulbaktam, TZP: Piperasilin/tazobaktam, CAZ: Seftazidim, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, GM: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, LVX: Levofloksasin, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol, AK: Amikasin, CTX: Sefotaksim, FEP: Sefepim

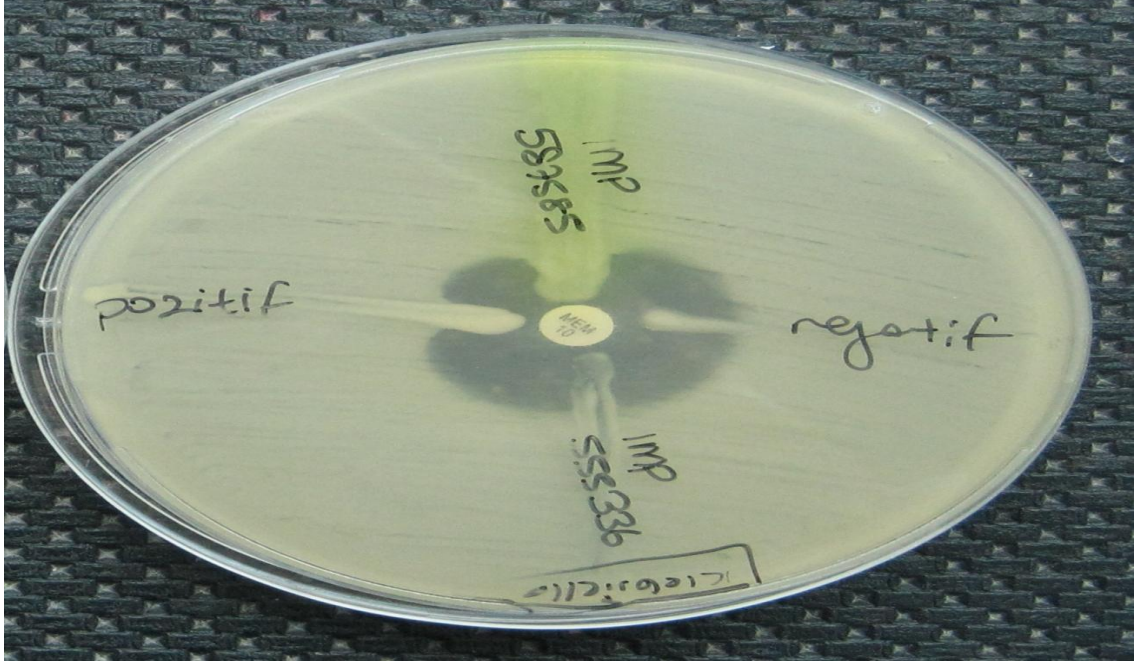
6.3 Metallo beta laktamaz tayininde kullanılan fenotipik testler

Kombine disk testi ile 74 ABC izolatının 4' ünde (%5.4) Kombine disk testi pozitif, 70' i (%94.5) negatif bulunmuştur. Kombine disk testi pozitif olan bir izolat Resim 2' de gösterilmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MBL pozitif iki *P. aeruginosa* izolatının VIM-5 pozitif izolat kombine disk testi ile pozitif sonuç verirken, IMP-1 pozitif izolat negatif sonuç vermiştir.



Resim 2. Kombine disk testi ile fenotipik olarak MBL üretimi

Çalışmaya alınan 74 ABC izolatında MBL' nin fenotipik tayini için kullanılan diğer bir test modifiye Hodge test (MHT)'dir. Biri *E. coli* ATCC 25922 diğeri *K. pneumoniae* ATCC 700603 olmak üzere iki ayrı standart suş ile ayrı ayrı MHT çalışılmıştır ve her ikisi ile de sonuçlar uyumlu bulunmuştur. MHT ABC izolatının ile izolatların birinde (%1.35) MHT pozitif, 73' ünde (%98.65) ise negatif bulunmuştur. MHT ile fenotipik olarak MBL pozitif bulunan 1 izolat Resim 3' de gösterilmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MBL pozitif olduğu bilinen iki izolat MHT ile pozitif bulunmuştur.



Resim 3. MHT ile fenotipik olarak MBL üretimi

Kombine disk yöntemiyle pozitif saptanan 4 izolat, MHT ile negatif sonuç verirken; MHT' ye göre pozitif saptanan 1 izolat kombine disk yöntemiyle negatif sonuç vermiştir. Her iki testin de negatif olduğu izolat sayısı 69 iken, her iki testin pozitif olduğu izolat saptanmamıştır. İki yöntem arasındaki uyum %93.24 olarak belirlenmiştir. Tablo 12' de MHT test ve kombine disk sonuçları karşılaştırılmıştır.

Tablo 12. MBL üretimini araştırmak için kullanılan iki fenotipik yöntemle pozitif ve negatif bulunan izolat sayısı

| | Kombine Disk (+) | Kombine Disk (-) | Toplam |
|--------------------|------------------|------------------|--------|
| Modifiye Hodge (+) | 0 | 1 | 1 |
| Modifiye Hodge (-) | 4 | 69 | 73 |
| Toplam | 4 | 70 | 74 |

6.4 Metallo beta laktamaz enziminin moleküler yöntemle gösterilmesi

Çalışmaya alınan 74 ABC izolatında; *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP-1}*, *bla_{IMP-2}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{VIM-2}*, *bla_{SIM-1}*, *bla_{GIM-1}*, *bla_{SPM-1}* genlerinin korunmuş bölgelerine özgül farklı primer setleri kullanılarak PCR metodu ile incelenmiş ve bu genlerden hiçbiri saptanmamıştır.

6.5 Oksasilinaz enziminin moleküler yöntemle gösterilmesi

6.5.1 *bla*_{OXA-23} like geninin amplifikasyonu

*bla*_{OXA-23-like} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 74 ABC izolatından 26 tanesinde 501 bp büyüklüğünde ürün tanımlanmıştır. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 4’de sunulmuştur.

6.5.2 *bla*_{OXA-24} like geninin amplifikasyonu

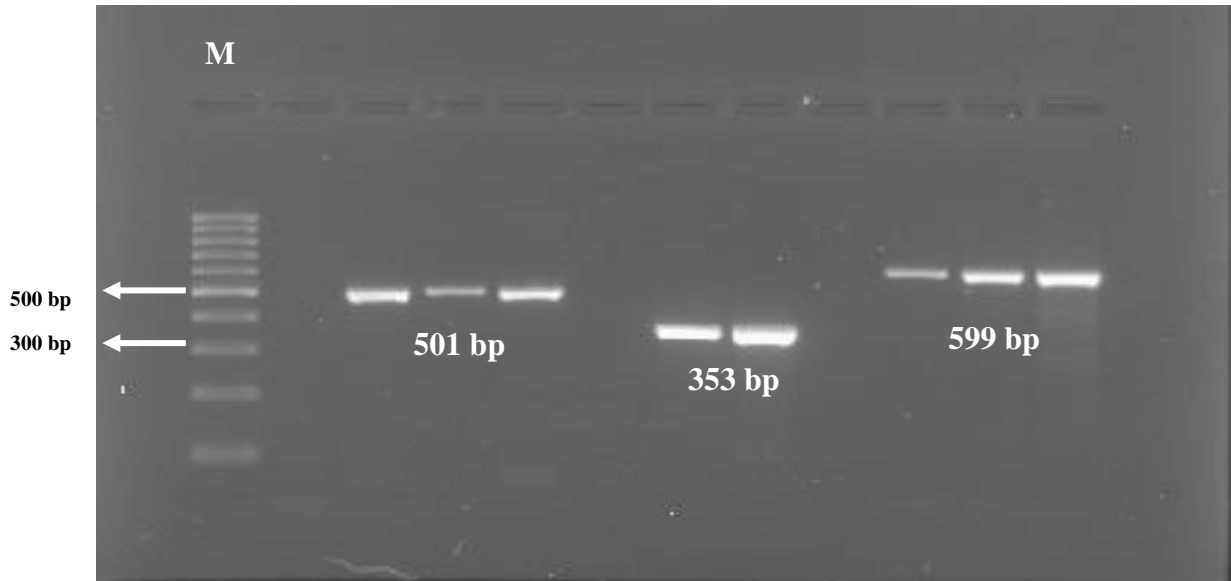
*bla*_{OXA-24-like} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 74 ABC izolatının hiç birinde 246 bp büyüklüğünde ürün saptanmamıştır.

6.5.3 *bla*_{OXA-51} like geninin amplifikasyonu

*bla*_{OXA-51-like} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 74 ABC izolatının tümünde 353 bp büyüklüğünde ürün tanımlanmıştır. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 4’de sunulmuştur.

6.5.4 *bla*_{OXA-58} like geninin amplifikasyonu

*bla*_{OXA-58-like} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 74 ABC izolatından 32’inde 599 bp büyüklüğünde ürün tanımlanmıştır. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 4’de sunulmuştur.



Resim 4. *bla*_{OXA} geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: 100 bp DNA Marker, 1: Negatif kontrol, 2: OXA-23 Pozitif kontrol 3: AB037, 4: AB050, 5: Negatif kontrol, 6: OXA-51 Pozitif kontrol, 7: AB050, 8: Negatif kontrol, 9: OXA-58 Pozitif kontrol, 10: AB058, 11: AB066

6.5.5 Araştırma grubuna ait *bla*_{OXA} PCR sonuçları ve gönderildiği birimler

Araştırmamıza ait 74 ABC izolatının PCR sonuçları Tablo 13' de sunulmuştur.

Tablo 13. Araştırma Grubuna ait *bla*_{OXA} PCR Sonuçları

| İzolat Kodu | <i>bla</i> _{OXA-23-like} | <i>bla</i> _{OXA-24-like} | <i>bla</i> _{OXA-51 like} | <i>bla</i> _{OXA-58 like} |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| AB001 | - | - | + | - |
| AB002 | - | - | + | - |
| AB003 | - | - | + | - |
| AB004 | - | - | + | - |
| AB005 | - | - | + | - |
| AB006 | - | - | + | - |
| AB007 | - | - | + | - |
| AB008 | - | - | + | - |
| AB009 | - | - | + | + |
| AB010 | - | - | + | + |
| AB011 | - | - | + | - |
| AB012 | - | - | + | - |
| AB013 | - | - | + | + |
| AB014 | - | - | + | - |
| AB015 | - | - | + | + |
| AB016 | - | - | + | - |
| AB017 | - | - | + | - |
| AB018 | - | - | + | - |
| AB019 | - | - | + | - |
| AB020 | - | - | + | - |
| AB021 | - | - | + | + |
| AB022 | - | - | + | + |
| AB023 | - | - | + | + |
| AB024 | - | - | + | - |
| AB025 | - | - | + | + |
| AB026 | - | - | + | + |
| AB027 | - | - | + | + |
| AB028 | - | - | + | - |
| AB029 | - | - | + | - |
| AB030 | - | - | + | + |
| AB031 | - | - | + | + |

| İzolat Kodu | <i>bla</i> _{OXA-23-like} | <i>bla</i> _{OXA-24-like} | <i>bla</i> _{OXA-51 like} | <i>bla</i> _{OXA-58 like} |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| AB032 | - | - | + | + |
| AB033 | - | - | + | + |
| AB034 | - | - | + | + |
| AB035 | - | - | + | + |
| AB036 | + | - | + | - |
| AB037 | + | - | + | + |
| AB038 | + | - | + | - |
| AB039 | - | - | + | + |
| AB040 | - | - | + | + |
| AB041 | + | - | + | - |
| AB042 | - | - | + | + |
| AB043 | - | - | + | + |
| AB044 | - | - | + | + |
| AB045 | - | - | + | + |
| AB046 | - | - | + | + |
| AB047 | - | - | + | + |
| AB048 | + | - | + | - |
| AB049 | - | - | + | + |
| AB050 | + | - | + | + |
| AB051 | - | - | + | + |
| AB052 | + | - | + | - |
| AB053 | + | - | + | - |
| AB054 | - | - | + | + |
| AB055 | + | - | + | - |
| AB056 | + | - | + | - |
| AB057 | + | - | + | - |
| AB058 | + | - | + | + |
| AB059 | + | - | + | - |
| AB060 | + | - | + | - |
| AB061 | + | - | + | - |
| AB062 | + | - | + | - |
| AB063 | + | - | + | - |
| AB064 | + | - | + | - |
| AB065 | + | - | + | - |

| İzolot Kodu | <i>bla</i> _{OXA-23-like} | <i>bla</i> _{OXA-24-like} | <i>bla</i> _{OXA-51 like} | <i>bla</i> _{OXA-58 like} |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| AB066 | - | - | + | + |
| AB067 | - | - | + | + |
| AB068 | + | - | + | - |
| AB069 | + | - | + | - |
| AB070 | + | - | + | - |
| AB071 | + | - | + | - |
| AB072 | + | - | + | - |
| AB073 | + | - | + | - |
| AB074 | + | - | + | - |

OXA 23 ve OXA 58 pozitif izolatların gönderildiği birimler Tablo 14' de gösterilmiştir.

Tablo 14. OXA-23 ve OXA-58 pozitif izolatların gönderildiği birimler

| Birim | İzolot kodu | OXA 23 | OXA 58 |
|------------------------------|-------------|--------|--------|
| Cerrahi yoğun bakım ünitesi | AB009 | - | + |
| | AB010 | - | + |
| | AB013 | - | + |
| | AB015 | - | + |
| | AB021 | - | + |
| | AB022 | - | + |
| | AB023 | - | + |
| | AB025 | - | + |
| | AB030 | - | + |
| | AB031 | - | + |
| | AB032 | - | + |
| | AB036 | + | - |
| | AB037 | + | + |
| | AB038 | + | - |
| Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi | AB055 | + | - |
| | AB058 | + | + |
| | AB063 | + | - |
| Cerrahi yoğun bakım ünitesi | AB064 | + | - |
| | AB065 | + | - |
| | AB067 | - | + |
| | AB073 | + | - |

| Birim | İzolot kodu | OXA 23 | OXA 58 |
|--|-------------|--------|--------|
| Cerrahi yoğun bakım ünitesi | AB039 | - | + |
| | AB040 | - | + |
| | AB044 | - | + |
| | AB045 | - | + |
| | AB054 | - | + |
| | AB057 | + | - |
| | AB060 | + | - |
| | AB066 | - | + |
| | AB070 | + | - |
| Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi | AB035 | - | + |
| | AB042 | - | + |
| | AB056 | + | - |
| | AB071 | + | - |
| | AB074 | + | - |
| Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi | AB048 | + | - |
| | AB069 | + | - |
| Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi | AB033 | - | + |
| | AB046 | - | + |
| Dahiliye Servisi | AB050 | + | + |
| | AB059 | + | - |
| | AB062 | + | - |
| Kalp Damar Cerrahi Servisi | AB049 | - | + |
| | AB051 | - | + |
| | AB052 | + | - |
| | AB053 | + | - |
| Göğüs Hastalıkları Servisi | AB041 | + | - |
| | AB043 | - | + |
| Genel Cerrahi Servisi | AB027 | - | + |
| Pediyatri, Hematoloji-onkoloji servisi | AB068 | + | - |
| Dahiliye-Onkoloji Servisi | AB047 | - | + |
| Acil Poliklinik | AB034 | - | + |
| Beyin Cerrahi Polikliniği | AB061 | + | - |

6.5.6 OXA enzimi üreten izolatların karbapenem duyarlılık verileri

OXA pozitif izolatların karbapenem grubu ajanlardan imipenem ve meropenem duyarlılık verileri Tablo 15' de sunulmaktadır.

Tablo 15. OXA pozitif izolatların karbapenem grubu antibiyotik duyarlılık verileri

| | Duyarlı | | Orta Duyarlı | | Dirençli | |
|---|--------------|--------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| | IPM (n=4) | MEM (n=5) | IPM (n=10) | MEM (n=24) | IPM (n=60) | MEM (n=45) |
| <i>bla</i> _{OXA-23-like} (n=26) | 0 | 0 | %20 (2) | 0 | %40 (24) | %57.8 (26) |
| <i>bla</i> _{OXA-51 like} (n=74) | %100 (4) | %100 (5) | %100 (10) | %100 (24) | %100 (60) | %100 (45) |
| <i>bla</i> _{OXA-58 like} (n=32) | 0 | 0 | %30 (3) | %79.17 (19) | %48.33 (29) | %28.9 (13) |

IPM: İmipenem, MEM: Meropenem

6.5.7 OXA enzimi üreten genlerin birlikte bulunma durumları

Çalışmamızda belirlenen direnç genlerinin izolatlarda birlikte bulunma durumlarına ait veriler Tablo 16' da sunulmuştur.

Tablo 16. İzolatlardaki OXA genlerinin birlikte bulunma durumları

| OXA Enzim üreten genler | İzolot sayısı | Toplam n=74 (%) |
|---|---------------|-----------------|
| <i>bla</i> _{OXA-23-like} + <i>bla</i> _{OXA-51 like} | 26 | %35.16 |
| <i>bla</i> _{OXA-23-like} + <i>bla</i> _{OXA-58 like} | 3 | %4.05 |
| <i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-58 like} | 32 | %43.24 |
| <i>bla</i> _{OXA-23-like} + <i>bla</i> _{OXA-51 like} + <i>bla</i> _{OXA-58 like} | 3 | %4.05 |

6.5.8 DNA dizi analizi

Kromotogram sonuçları ChromasPro programı ile görüntülenmiş, elde edilen nükleotid dizileri BLAST programında mevcut nükleotid dizileri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda AB037 kodlu izolatın üç okzasilnaz enzim genini de taşıdığı doğrulanmıştır.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

A. baumannii complex zorunlu aerob, oksidaz negatif, nonfermentatif gram negatif kokobasildir. Doğada, toprakta ve sulara yaşayabildiği gibi hastane ortamında personelden hastaya veya hastadan hastaya bulaşmaktadır. Patojenitesi düşük olduğundan 1960' lı yıllarda göz ardı edilmiş 1970' li yılların başlarında hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilmeye başlanmıştır. *Acinetobacter* izolatları hastane koşullarında hem daha kolay barınma olanağı bulmakta hem de direnç kazanma şansı artmaktadır. Kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalması, birçok antimikrobiyal ajana ve dezenfektanlara direnç geliştirmesi hastanelerde devamlılığını sürdürmesini sağlamaktadır (1, 4, 20, 128).

ABC sağlıklı insanlar için patojen olmayan ancak immün yetmezliği olanlarda, malign veya metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli ventilatör desteği alanlarda, yakın dönemde cerrahi işlem uygulanmış olanlarda, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde en önemli enfeksiyon etkenlerinden biridir. İnvaziv işlemlerin sıklıkla uygulandığı, antibiyotiklerin kontrolsüz kullanıldığı hastane birimlerinde, özellikle YBÜ ve cerrahi kliniklerinde, hastane enfeksiyonu etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedir (3, 23, 24).

ABC izolatları, hastanemizin Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi' ne Ocak 2008-Aralık 2009 tarihleri arasında gelen kan örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların %77.03' ünün YBÜ' lerinden, %20.27' sinin servislerden, %2.7' sinin polikliniklerden gönderildiği saptanmıştır. Wisplinghoff ve arkadaşlarının Amerika' da yaptığı 7 yılı kapsayan sürveyans çalışmasında 49 hastaneden prospektif olarak toplanmış YBÜ' lerinden izole edilen hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonu etkenleri arasında *A. bauamnnii* insidansının diğer patojenlerden fazla olduğu tespit edilmiştir (40). Leblebicioğlu ve arkadaşlarının çalışmasında Türkiye' de 10 merkezden toplanmış karbapenemlere dirençli 596 izolatın % 51' i YBÜ' den izole edilmiştir. YBÜ' lerinden izole edilenlerin ise %40.4' ü kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olduğu görülmüştür ve bunların % 8.9' u *A. bauamnnii* olarak rapor edilmiştir (129). Çalışmamızda karbapenem dirençli ABC izolatları kan kültürlerinde en sık etken olarak rapor edildiği birim cerrahi yoğun bakım ünitesidir. *Acinetobacter* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tümünün hastaneye yatış sonrasında gelişen hastane kaynaklı enfeksiyonlar oldukları belirlenmiştir.

Dirençli izolatlar, kullanılan antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirmeleri ve sıkça izole edilmeleri ile hastanelerde ciddi sağlık sorunları oluşturmaktadır. Birçok antimikrobiyal ajana dirençli olmalarına rağmen, geniş spektrumlu penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler veya bu grup antimikrobiyallerin bir aminoglikozid veya kinolon grubu antibiyotik ile kombinasyonu *A. baumannii* enfeksiyonlarında en sık kullanılan tedavi seçenekleridir.

ABC enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla karbapenem grubu ajanlar tercih edilmektedir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* insidansı dünyanın çeşitli ülkelerinde artmaktadır. Avrupa' da, *A. baumannii* izolatlarının karbapenem duyarlılığını araştırmak amacıyla 1997-2000 yıllarını kapsayan Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programında karbapenemlerin %93-100' üne karşı etkili oldukları bulunmuştur (131). Ülkemizde 2000-2004 yıllarını kapsayan MYSTIC programında *Acinetobacter* meropeneme duyarlılığı %53, imipeneme duyarlılığı %48 olarak rapor edilmiştir (132). Patzer ve arkadaşlarının Polanya' daki 1997-2007 yıllarını kapsayan MYSTIC programında karbapeneme duyarlılık oranı %100 olarak saptanmıştır. Avrupa' da yapılan MYSTIC programında ise *Acinetobacter* izolatlarının karbapenemlere karşı duyarlılığının azalması dikkat çekmektedir. Avrupa' da 2002-2006 yıllarını kapsayan çalışmada karbapenemlere duyarlı izolatların oranının %58' e düşmesi çoğul dirençli *Acinetobacter* izolatlarının artışını yansıtmaktadır (133, 134). Bedenic ve arkadaşlarının 2010 yılında gerçekleştirdiği MYSTIC programında *A. baumannii* izolatlarının karbapenem direncinin arttığı vurgulanmıştır (135). Karbapenem duyarlılığında bölgesel farklılıkların olduğu çeşitli çalışmalarda açıklanmaktadır. Çalışmamızda karbapenem grubu ajanlardan imipeneme 2008 yılında %64.52 dirençli izolat saptanmış, 2009 yılında ise %93.02' si dirençli olarak saptanmıştır. Meropeneme 2008 yılında izolatların %48.39' u direçliyken, 2009 yılında %69.77' si dirençli tespit edilmiştir. Ciddi enfeksiyonlara sahip hastalardan izole edilen Gram negatif basillerin; doripenem, imipenem ve meropeneme olan duyarlılıklarını karşılaştırmak için 2011 yılında Avrupa, Orta Asya ve Afrika' daki 16 ülkenin 80 merkezinden toplanarak yapılan Comparative activity of carbapenem testing (COMPACT) araştırmasında, *A. baumannii* izolatlarının bahsedilen üç ajana yüksek oranda dirençli (MİK₉₀ ≥64 mg/L.) olduğu rapor edilmiştir (136). Leblebicioğlu ve arkadaşlarının 2012 yılında ülkemizde yaptığı COMPACT araştırmasında da *A.*

baumannii doripenem, imipenem ve meropenem'e yüksek oranda dirençli (MİK₉₀ ≥ 64mg/L) olduğu saptanmıştır (129).

Çalışmalarda da bahsedildiği gibi karbapenem direncinin yıllara göre artışı dikkat çekmektedir. Karbapenem grubu ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmaları porin proteinlerinin yapısında değişiklik, penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik, beta laktamaz üretimi ve kromozal AmpC enzimi sentezlemeleridir. Son zamanlarda karbapenemlere dirençte en sık adı geçen mekanizmalar sınıf B ve sınıf D karbapenemaz üretimidir.

Sınıf B karbapenemaz enzimleri aztreonam dışındaki tüm beta laktamazları hidrolize etme özelliğine sahiptir ve metallo beta laktamaz olarak adlandırılır. Beta laktamaz inhibitörlerinden sulbaktam, tazobaktam ve klavulanik asitten etkilenmezler. Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurduklarından in vitro olarak EDTA, 2-merkaptopropionik asit ve sodium mercaptoacetic asit gibi metal şelatörleriyle inhibe olurlar. Yapılan çalışmalara bakıldığında en çok saptananlar IMP ve VIM tipi metallo enzimler; nadir rastlanan SIM, GIM ve SPM tipi metallo enzimlerdir. Diğer gram negatif patojenler arasında, kazanılmış karbapenem direncinden sorumlu NDM, KHM, AIM, DIM tipi MBL enzimlerinden son yıllarda sıkça bahsedilmektedir.

Metallo beta laktamaz kodlayan genler sınıf 1 ve 3 integronlar içerisinde yer alan gen kasetlerinde bulunmaktadır. İçinde bir veya birden fazla gen kaseti taşıyabilen integronlar konjugatif plazmidler veya transpozonlar tarafından taşınıp bakteriler arasında aktarılabilirler. Gen kasetleri integronlar arasında taşınarak direncin yayılımına sebep olabilmektedirler. MBL üreten mikroorganizmalarda direncin yayılımı klonal ya da gen transferiyle yani horizontal aktarımla olabilmektedir (74, 82) Kore' de yapılan bir çalışmada VIM-2 saptanan *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarının her ikisinde bulunan integron yapılarının aynı olduğu saptanmıştır (137). Japonya' da IMP-1 geninin *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Brevium diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter (Alkaligenes) xylosoxydans*, *Pseudomonas putida* ve *A. baumannii* türlerinde saptanmıştır. Çalışmalarda da söz edildiği gibi farklı türler arasında horizontal transferin olduğu belirtilmiştir (85). Horizontal aktarım, karbapenemler dahil olmak üzere monobaktamlar dışında tüm beta laktamlara direnç gelişmesi ve gen kasetlerinde aminoglikozit ve florokinolon direnç genlerinin birlikte

taşınması nedeniyle epidemiyolojik risk oluşturmaktadır. MBL taşıyan mikroorganizmanın çevresel kontaminasyonu, yüzeylerde uzun süre barınabilmesi, sağlık çalışanlarında kolonizasyonu ve hastaların kolonize ya da enfekte olması klonal yayılım için temel nedenlerdendir.

Hastanelerde direnç aktarımının önlenmesi ve tedavinin optimum seviyede uygulanabilmesi açısından MBL enzim varlığının araştırılması önemlidir. MBL enzim varlığının araştırılmasına yönelik klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin uygulanabilir testler CLSI' da henüz bulunmamaktadır. MBL tespitinde, fenotipik metotların birçok ülkede standart olmaması, duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek testi bulmak için yapılan araştırmaların sayısını artırmaktadır. MBL varlığını araştırmak için kombine disk testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testi ve MBL E-test gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bulunan sonuçlar PCR sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Fenotipik yöntemler olumlu sonuçlar verebilir fakat test sonuçlarında yalancı pozitiflikle karşılaşılabilir (76, 79, 82, 106, 107).

Metallo beta laktamaz tayini için uygulanan fenotipik testlerde temel prensip in vitro koşullarda mikroorganizmanın taşıdığı enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonunun metal şelatör tarafından inhibisyonudur. Bu prensibe dayanarak uygulanan testlerden biri imipenem-EDTA kombine disk testidir. Bir imipenem ve üzerine EDTA eklenmiş ikinci bir imipenem diski ile yapılmış disk diffüzyon yönteminde disklerin inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 7 mm' nin üzerinde olması, metallo beta laktamaz varlığı açısından pozitif kabul edilmektedir (121). Yong ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada 750 µg EDTA içeren disklerin kullanıldığı yöntem ile tüm VIM-2 pozitif *Pseudomonas* izolatlarını ayırt edebilmiştir. IMP-1 pozitif *Acinetobacter* izolatlarında ise imipenem-EDTA kombine disk testinin duyarlılığını %95.7, özgüllüğünü %91.0 olarak saptamışlardır (138). Peleg ve arkadaşları 2006 yılında MBL varlığı bilinen gram negatif 84 izolat için çalıştıkları kombine disk testi de duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak rapor etmişlerdir (139). Jesudason ve arkadaşları MBL üretimini tespit etmede imipenem-EDTA kombine disk testini, modifiye Hodge testine göre daha duyarlı bulmuşlardır (140). Noyal ve arkadaşları benzer şekilde kombine disk testinin MHT' e göre daha duyarlı olduğunu tespit etmiştir (123). Pitout ve arkadaşları 2006 yılında MBL üretimini tespit etmek için kombine disk testini imipenem ve meropenem

disklerini tek başına ve bu disklerin 930 µg EDTA kombinasyonu ile çalışmıştır. Sonuçlara bakıldığında *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* genlerine sahip izolatlarda meropenem-EDTA disk testinin imipenem-EDTA kombinasyonuna göre daha duyarlı ve özgül olduğu görülmüştür. Tek başına ve kombinasyonlu disklerin inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 7 mm ve üzerinde olması MBL varlığı açısından pozitif kabul edilmiştir. Pitout'un bu çalışmasında kombine disk testinde meropenemin imipenemden daha iyi bir substrat olduğu vurgulanmıştır (121). Irfan ve arkadaşlarının yaptığı kombine disk testinde 100 çoğul dirençli *Acinetobacter* izolatının %96.6' sında fenotipik olarak MBL üretimi saptanmıştır (141). Çin' de yapılan bir çalışmada 71 *Acinetobacter* izolatının tamamı MHT ile pozitif bulunurken, kombine disk testiyle %54.9' u pozitif bulunmuştur (142). *bla_{VIM-1}* geni taşıyan izolatların fenotipik olarak tayin edilmesinde imipenem ve EDTA' nın duyarlılığının yüksek olduğu vurgulanmıştır. Buna rağmen İkonomidis ve arkadaşlarının MBL E-test, imipenem/ imipenem-EDTA kombine disk testi ve imipenem/ EDTA çift disk sinerji testlerinden herhangi biriyle *A. baumannii* izolatlarında MBL pozitifliğine rastlanmazken PCR yöntemi ile *bla_{VIM-1}* geni taşıyan izolatlar bulunmuştur (143). Karthika ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada izolatların %42' si fenotipik testlerle %70.9' u ise moleküler yöntemlerle pozitif bulunmuştur (144). Sesli-Çetin ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada *A. baumannii* izolatlarında kombine disk (%75), çift disk sinerji (%84), modifiye Hodge (%74) ve MBL E test (%80) yöntemleri ile fenotipik olarak pozitiflik oranı benzer bulunmuştur (145). Çıkman ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada kombine disk testi ile izolatların %79' unda, MHT ile %97' sinde MBL üretimi saptanmıştır (146). Ulusoy Al ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise MBL E test, kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testi olmak üzere dört fenotipik yöntemle MBL üretimi ve moleküler yöntemlerden PCR ile *bla_{IMP-1}* gen varlığı araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında E test ile 41, kombine disk testi ile 46, çift disk sinerji testi ile 44 ve modifiye Hodge test ile 55 *Acinetobacter* izolatının MBL ürettiği saptanmıştır. İzolatların hiç birinde PCR ile *bla_{IMP-1}* geni tespit edilmemiştir (147). Eser ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 124 *Acinetobacter* izolatının 64' ünde kombine disk testi pozitif bulunurken, PCR ile MBL üreten gen saptanmamıştır (148).

Kombine disk testi için Pitout ve arkadaşlarının kullandığı yöntemden farklı olarak yukarıda bahsedilen çalışmalarda 750 µg EDTA ve substrat olarak da imipenem

kullanmışlardır. Araştırmaların bazılarında kombine disk testi, moleküler yöntemlerle karşılaştırılmış ve sonuçlar uyumlu bulunmamıştır (143, 147). Çalışmamızda, Pitout ve arkadaşlarının kullandığı kombine disk yöntemiyle 74 ABC izolatının 4' ü (%5.4) pozitif bulunmuşken PCR sonuçlarına göre MBL üreten genlerden hiçbiri saptanmamıştır. VIM-5 pozitif olduğu bilinen pozitif izolatı kombine disk testiyle olumlu sonuç verirken, IMP-1 pozitif olduğu bilinen diğer pozitif kontrol izolatı ise kombine disk testi ile negatif saptanmıştır.

Karbapenemaz üretiminin tayininde kullanılan “Modifiye Hodge Testi”(MHT) metallo beta laktamazların fenotipik olarak tespiti için uygulanabilmektedir. Bu testin temel prensibi, MBL üreten bir bakteri varlığında imipeneme duyarlı olan bir *E. coli* izolatının, enzim tarafından imipenemin hidrolize olması nedeniyle üreme kabiliyetini tekrar kazanmasıdır. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. izolatları için MHT ile PCR sonuçları karşılaştırıldığında MHT' nin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak saptamışlardır (122). Ancak aynı araştırmacı grubu 2003' de yaptıkları bir başka çalışmada MBL üretimi tespitinde MHT yöntemi ile yanlış sonuçlar alınabileceğini vurgulamaktadır (149). Hee Young Yang ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada kombine disk testi ile izolatların hiç birinde MBL üretimi saptanamazken, MHT sonucuna göre ise tümünde karbapenemaz üretimi saptanmıştır. PCR sonuçlarına göre tüm izolatlarda OXA tipi karbapenemaz varlığı tespit edilmiştir (150). Başustaoglu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *A. baumannii* izolatlarında MHT ile karbapenemaz üretimi tespit edilmiş fakat moleküler yöntemlerle MBL geni saptanmamıştır. Bu çalışmada PCR ile OXA tipi karbapenemazlarla ilişkili genler izolatların tümünde tespit edilmiştir (153).

Bahsedilen çalışmalarda (122, 149, 150, 151) modifiye Hodge testlerinde standart suş olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Pasteran ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada *K. pneumoniae* ATCC 700603 standart suşunu kullanmıştır. İndikatör suşun duyarlılığını %100, özgüllüğünü %97 ve testin tekrar edilebilirliğini ise %100 olarak saptanmıştır (124).

Çalışmamızda 74 ABC izolatında *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 standart suşlarıyla yapılan MHT ile sadece 1 (%1.35) izolat fenotipik olarak

MBL pozitif bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan IMP-1 ve VIM-5 pozitif olduğu bilinen iki izolat her iki kullanılan testte de pozitif bulunmuştur.

Kombine disk testi ve MHT arasındaki uyum %93.94 oranında saptanmıştır. Uygulanan kombine disk testinde prensip; EDTA, MPA ve SMA gibi metal şelatörlerle MBL enziminin inhibisyonudur. MHT' inde ise test edilecek bakterinin imipenemi hidrolizi ile karbapenemaz tespit edilmektedir. İmipenem hidrolizine test edilecek izolatta MBL enzimi dışında OXA enzim üretimi ya da yüksek düzeyde sentezlenen AmpC enzimi üretimi sebep olabilmektedir (128).

Dünyada *Acinetobacter* türleri için saptanmış olan metallo beta laktamaz üretiminden sorumlu *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{SIM}* genleri, sınıf 1 integronlara entegre olmuş gen kasetlerinde bulunmaktadır. *Acinetobacter* türlerinde MBL kodlayan genlerden; *bla_{IMP}* İtalya, Japonya, Portekiz, Brezilya; *bla_{VIM}* Kore, Yunanistan, *bla_{SIM}* Kore gibi ülkelerden bildirilmiştir (154). Kaase ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *bla_{GIM}* geni sınıf 1 integronun bir parçası olarak 4 *A. pittii* izolatında saptanmıştır (155). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* izolatlarında fenotipik yöntemlerle MBL üretiminin araştırıldığı yayın sayısı oldukça fazladır (145, 146). Moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda MBL enzimi üreten *Acinetobacter* kökeni henüz tespit edilmemiştir (147, 148). MBL' ler ülkemizde *P.aeruginosa*, *P. putida*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* türlerinde saptanmıştır. Literatürlerden elde edilen veriler incelendiğinde MBL enzim üreten *Acinetobacter* kökenleri belli ülkelerde endemik olabilmektedir (74, 76). Fenotipik testlerde yalancı negatiflik sorunlarıyla karşılaşmaktadır. Kliniklerde tedaviye yön vermek ve dirençli izolatların yayılımını önlemek için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında güvenilirliği kabul edilmiş standart bir test hala bulunmamaktadır.

Acinetobacter izolatları için karbapenem direncine OXA tipi enzimler de sebep olmaktadır. Ambler sınıflamasında sınıf D' de yer alan bu enzimler serin oksasilineazlar ya da OXA tipi karbapenemazlar olarak adlandırılmaktadırlar. Karbapenemaz aktivitesine sahip OXA tipi enzimler ise karbapenem hidrolize eden sınıf D beta laktamaz (KHDL) olarak adlandırılmaktadır. Oksasilineazlar in vitro koşullarda sodyum klorür ile inhibe olurlar. OXA enzimi üreten izolatlar penisilin, kloksasilin, oksasilin ve metisiline direnç gösterirler. Geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edemezler. Oksasilineazların imipenem hidrolizi meropenem hidrolizinden daha hızlıdır.

Karbapenem direncine sebep olan OXA genleri sınıf 1 integronlar, insersiyon sekansları ve transpozonlar gibi spesifik genetik yapılarla taşınabilirler (110, 111, 128).

Oksasilinaz enzimleri karbapenem hidrolizini düşük seviyede yapmaktadırlar. Heritier ve arkadaşları yaptığı çalışmada *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, and *bla*_{OXA-58} geni taşıyan izolatların yüksek düzeyde AdeABC eflüx pompasının ekspresyonuyla birlikte karbapenem direncinin artışı vurgulamıştır (151). Hee Young Yang ve arkadaşları 49 imipenem dirençli *A. baumannii* izolatının tümünde *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genlerini tespit etmiş ve izolatların; antimikrobiyal ajanlardan siprofloksasin ve gentamisine %100; sefepim, piperasilin/tazobaktam, aztreonam, seftazidim ve piperasiline %97.9; tobramisine %93.9; amikasine ise %57.1 oranında direnç saptamıştır (149). Kohlenberg ve arkadaşları Almanya' da; penisilin, sefalosporin, siprofloksasin, gentamisin tobramisin, imipenem ve meropenem dirençli *A. baumannii* salgın izolatında rep-PCR yöntemleri ile *bla*_{OXA-23} geni varlığı saptamış ve salgın izolatının PFGE yöntemiyle Avrupa klonu 2 ile klonal ilişkisi olduğunu belirlemişlerdir (152).

Çalışmamızda geniş spektrumlu sefalosporinlerden; seftazidim ve sefotaksime tüm izolatlar dirençli, sefepime ise 63 izolat dirençli bulunmuştur. OXA enzim üretimi varlığı fenotipik yöntemlerden modifiye Hodge test, moleküler yöntemlerden PCR analizi ve DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılmıştır. Karbapenemaz üretiminin değerlendirildiği MHT verilerine göre 1 izolatta meropenem hidrolizi saptanmıştır. Fakat PCR ile OXA-23 geni saptanan izolatlarda MHT negatif olarak tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda fenotipik testler ile karbapenemaz üretiminin saptandığı izolatlarda PCR ile oksasilinaz enzimini kodlayan genler tespit edilmiştir (150, 151). Çalışmamızda PCR analizi ile izolatların OXA tipi karbapenemaz ürettiği tespit edilmiştir.

Acinetobacter izolatlarında karbapenem direnci ile ilişkili oksasilinazlar OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 tipi enzimlerdir. Bu 4 grup kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır. OXA-23 grubu içinde OXA-27, -40, -49 tipi enzimler; OXA-24 grubu içinde OXA-25, -26, -40, -72 tipi enzimler, OXA-51 grubu içinde OXA-64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82 ve -143 tipi enzimler, OXA-58 grubu içinde OXA-96, -97 tipi enzimler bulunmaktadır (110).

Ülke çapında salgınlara sebep olan çoğul dirençli *A. baumannii* AYE izolatu ve birçok antimikrobiyal ajana duyarlı *A. baumannii* SDF izolatının genomu Fransa' da 2003 yılında sekanslanmıştır. Fournier ve arkadaşlarının çalışmasında iki klinik izolatın genom sekansı sonuçlarına göre antimikrobiyal ajanlara, ağır metallere ve antiseptiklere direnç 52 gen ile ilişkili bulunmuş, 52 genin 45' inde ise 86 kb büyüklüğündeki bölge direnç adası olarak adlandırılmıştır. Tekrar eden beş nükleotid dizisinin dublikasyonu nedeni ile plazmid ve transpozonla taşınan insersiyon sekans dizileri direnç adası bölgesine kolayca entegre olabilmektedir. Oksasilinaz enzimlerinden OXA-23 ISAbal ya da ISAbal4 ile plazmid aracılı ya da kromozomal, OXA-24 kromozomal; OXA-58 ISAbal1, ISAbal2, ISAbal3 ya da IS18 ile plazmid aracılı ve OXA-51 ISAbal1 ile kromozomal olarak aktarılırlar (128, 156, 157).

Dünyada birçok ülkede OXA-23 geni taşıyan imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastane salgınlarda ya da sporadik vakalarda izole edilebilmiştir. Hastane salgınlara sebep olan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları son on yıl içerisinde Fransa, İngiltere, İspanya, Portekiz, Hollanda, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Bulgaristan, Yunanistan, İtalya ve Türkiye gibi Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir. Tigesiklin sürveyans çalışmalarında (TEST) 393 adet *A. baumannii* izolatının direnç oranları incelenmiş ve karbapenem direnç oranı 2007' de % 11.1 iken 2009' da % 8.2 olarak tespit edilmiştir (158). Avrupa' da 14 ülkeden gelen toplam 16 ülkenin katıldığı çalışmaya göre *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direncinin en fazla görüldüğü ülkeler; Türkiye (%50-80), Yunanistan (%85), İtalya (%60), İspanya (%45), ve İngiltere (%55) olup, Fransa (%10-20), Almanya (%8) ve İsveç (%4) daha az görüldüğü ülkelerdir. Avrupa' da *A. baumannii* salgın izolatlarında en çok OXA-23 tip ve OXA-58 tip enzimleri saptanmıştır. OXA-24 salgınlardan ziyade sporadik vakalarla bildirilmiştir (128). Bogaerts ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ülkeler arası yayılım gösteren OXA-58 üreten izolatların Yunanistan' dan Belçika' ya kadar saptanmış olması Avrupa' da güneyden kuzeye epidemik izolatların klonal yayılımını vurgulamaktadır.(157). Marque ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre OXA-58 karbapenemaz üreten *Acinetobacter* kökenleri, Avrupa' nın güneyi, Balkanlar ve Türkiye' de daha yaygın görülmektedir (160).

Avrupa' da karbapenem direnç oranları ülkelere göre farklı olsa da ülkeler arası klonal yayılıma sebep olan 3 epidemik Avrupa klonu bildirilmiştir. Klon 1 ve 2 Avrupa'nın kuzey batısındaki ülkelerin hastanelerinde salgınlardan sorumlu olan epidemik klonlardır. Klon 1 İspanya, Polonya ve İtalya; Klon 2 Çek Cumhuriyeti, İspanya, Portekiz, Güney Afrika, Fransa, Yunanistan ve Türkiye; Klon 3 ise Fransa, İtalya, Yunanistan ve Hollanda' dan bildirilen epidemik Avrupa klonlarıdır (161, 162).

Avrupa' dan başka Orta Doğu ve Asya' da karbapenem dirençli *Acinetobacter* kökenlerinde OXA tipi enzimler bildirilmiştir. Mendes ve arkadaşlarının 2009' da yaptığı SENTRY Sürveyans çalışmasında 10 ülkeden 544 *Acinetobacter* izolatu toplanmıştır. Altı ülkeden toplanan izolatların tümünde *bla*_{OXA-23} geni tespit edilmiştir. *bla*_{OXA-24/40} ve *bla*_{OXA-58} geni taşıyan izolat sayısı daha az sıklıkla, sadece iki izolatta ise *bla*_{IMP-4} ve *bla*_{VIM-2} geni saptanmıştır (163). Chao He ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2006-2009 yıllarını kapsayan YBÜ' den toplanan ABC izolatlarında *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} prevalansı daha fazla bulunmuştur (164). D'Arezzo ve arkadaşlarının İtalya' da yaptığı çalışmada YBÜ' lerinde salgınlara sebep olan çoğul dirençli *A. baumannii* izolatlarının önceki yıllarda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında OXA-58 prevalansının düştüğü ve OXA-23 prevalansının arttığı; tüm izolatların OXA-51 geni taşıdığı saptanmıştır. Direnç paternlerine bakıldığında OXA-23 pozitif izolatların tümü meropenem ve imipenem dirençli, OXA-58 pozitif izolatların ise tümü imipenem dirençli olduğu tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli izolatların MİK değerleri OXA-58 geni taşıyan izolatlarıyla kıyaslandığında OXA-23 geni taşıyan izolatlarında yüksek düzey imipenem direnci tespit edilmiştir.(165). Ikonmidis ve arkadaşlarının 2005-2009 yıllarını kapsayan çalışmasında imipenem direncinde ve OXA-23 pozitif izolatların yayılımında artış saptanmıştır. OXA-23 enzimi taşıyan izolatlarda meropenem hidrolizi %100 iken, OXA-58 enzimi taşıyan izolatlarda imipenem hidrolizi meropenemden daha etkili bulunmuştur. Enzim aktivitesindeki farklılıklar *bla*_{OXA-58-like} pozitif grupta meropenemin in vitro koşullarda aktivitesinin yüksek olduğunu kısmen açıklamaktadır. CarO porin yapısının modifikasyonu ve karbapenemaz genini taşıyan plazmitlerin kopya sayısı gibi karbapenem direncini etkileyen ek mekanizmaların da olduğu vurgulanmıştır (166). Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OXA-51 ve OXA-23 enzimlerinin IS*Abal* insersiyon elementleri ve eflüx pompasının ekspresyonu mekanizmaları ile karbapenem direncine neden olduğu tespit edilmiştir (167).

Bahsedilen çalışmalarda OXA-23 karbapenemaz üreten izolatların imipenem ve meropenem hidrolizinin yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir (165, 166). Çalışmamızda PCR ile saptadığımız OXA-23 karbapenemaz üreten 26 izolatın tümü meropeneme dirençli, imipeneme ise 24 izolat dirençli 2 izolat orta duyarlı olarak tespit edilmiştir. Karbapenemaz üreten 32 izolatta OXA-58 geni saptanmıştır. Çalışmalarda imipenem hidrolizinin daha yüksek olduğu belirtilirken çalışmamızda OXA enzimi üreten izolatların meropenem hidrolizi imipenem hidrolizinden fazla olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde Vahaboğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 6 bölgeden gelen toplam 72 *Acinetobacter* izolatında OXA-51 enzimi prevalansının yüksek düzeyde olduğuna ve ülkenin çeşitli bölgelerine dağılımına dikkat çekilmektedir. Çeşitli bölgelerde OXA-51 enzimiyle birlikte OXA-58 enziminin bulunması izolatların klonal çeşitliliğine ve pandrug dirençli izolatlar ile ilişkili bulunmuştur. Beta laktamazlardan özellikle OXA tipi enzimlerin ve bazı porin eflüx bariyerlerinin *Acinetobacter* direnç fenotipini belirleyen faktörler olduğu vurgulanmaktadır (168). Meriç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A. baumannii* salgın izolatlarında *bla*_{OXA-23} geni ile birlikte sürekli yüksek düzeyde sentezlenen kromozomal AmpC enzimi tespit edilmesi çoğul dirençle ilişkili bulunmuştur (169). Antimikrobiyal Sürveyans programında (SENTRY) rapor edilen verilere göre Ankara ve İstanbul' dan bildirilen, 44 adet karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatından; 18 izolatın OXA-58 ve 26 izolatın OXA-23 karbapenemaz ürettiği saptanmıştır. Moleküler yöntemlerle izolatların arasındaki klonal ilişki incelenmiş ve Ankara' dan bildirilen OXA 58 karbapenemaz üreten bütün izolatların PFGE paternlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Çalışmada Ankara ve İstanbul' daki OXA-58 karbapenemaz üreten izolatların PFGE paternlerinin ise farklı olduğu tespit edilmiştir. İki bölgeden bildirilen OXA-23 karbapenemaz üreten izolatlarda ise klonal ilişki olduğunun belirtilmesi ülkemizdeki kliniklerde klonal yayılımına dikkat çekmektedir (170). Özen ve arkadaşlarının YBÜ salgınından izole edilen *A. baumannii* izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri tanımlanmıştır. Çalışılan 23 hasta izolatı ve 11 çevresel örnekten izole edilen *A. baumannii* izolatlarının tek bir klondan aktarıldığı, çoğul dirençli izolatlar oldukları ve karbapenem hidrolize eden OXA-58 ve OXA-51 tipi enzim ürettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada YBÜ personelinin ellerinden izole edilen örneklerin % 25' inde

imipenem dirençli *A. baumannii* izolatu saptanmıştır (171). Kulah ve arkadaşlarının hastane enfeksiyonu etkeni olan 145 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında MBL ve OXA karbapenemaz üretimi moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. İzolatların % 79' unda OXA-58 PCR ile pozitif bulunmuştur. İzolatlarda MBL, OXA-23 ve OXA-24 kodlayan genlere rastlanmamıştır. Çalışılan izolatların Avrupa klonları 1, 2 ve 3 ile ilişkili bulunmadığı tespit edilmiştir (172). Aktaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; OXA-51 ve OXA-58 enzimleri tespit edilmiş izolatların imipenem, sefepim ve seftazidime yüksek derecede dirençli (MİK \geq 128 mg/ L) olduğu saptanmıştır (173). Ergin ve arkadaşlarının 2004-2010 yıllarında kan kültürlerinden izole edilen 100 *A. baumannii* izolatının %44' ünün YBÜ' lerden gönderildiği ve bu izolatların çoğul dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Karbapenem direnci ile ilgili olarak *bla*_{OXA-23} geni taşıyan izolatların imipenem ve meropenem için MİK₉₀ değerini 64 mg/L olarak saptamışlardır (174).

Avrupa ülkelerinde oksasilinaz enzimlerinden OXA-23 prevalansı daha yaygındır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise OXA-58 prevalansının daha yaygın olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda PCR ile *bla*_{OXA-23like} geni taşıyan 26 izolat saptanmıştır. Saptanan pozitif izolatların tümü 2009 yılında laboratuvarımıza gönderilmiştir. Pozitif izolatların 18' i YBÜ' den , 7' si servislerden ve 1' i polikliniklerden gönderildiği saptanmıştır.

Çalışmamızda *bla*_{OXA-58like} geni taşıyan 32 izolat saptanmıştır. Ülkemizdeki OXA-58 prevalansı verileri ile çalışmamızdaki veriler uyumlu bulunmuştur. Pozitif bulunan izolatların 2008' de 10' unun YBÜ' sinden, 2' sinin servislerden, 2009' da ise 14' ünün YBÜ' sinden, 5' inin servislerden ve 1' inin de polikliniklerden gönderildiği tespit edilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. OXA pozitif izolatların tespit edildiği birimler ve yıllara göre dağılımı

| Birim | OXA 23 | | OXA 58 | | |
|-------|------------------------------|------|--------|------|---|
| | 2008 | 2009 | 2008 | 2009 | |
| YBÜ | Cerrahi yoğun bakım ünitesi | - | 3 | 10 | 2 |
| | Anestezi yoğun bakım ünitesi | - | 6 | - | 2 |
| | Dahiliye-yoğun bakım ünitesi | - | 3 | - | 6 |

| | | | | | |
|------------|--|---|----|----|----|
| YBÜ | Göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesi | - | 4 | - | 2 |
| | Nöroloji yoğun bakım ünitesi | - | 2 | - | - |
| | Nöroşirurji yoğun bakım ünitesi | - | - | - | 2 |
| SERVİS | Dahiliye servisi | - | 3 | - | 1 |
| | Kalp damar cerrahi servisi | - | 2 | - | 2 |
| | Göğüs hastalıkları servisi | - | 1 | 1 | 1 |
| | Genel cerrahi servisi | - | - | 1 | - |
| | Pediyatri, hematoloji-onkoloji servisi | - | 1 | - | - |
| | Dahiliye-Onkoloji Servisi | - | - | - | 1 |
| Poliklinik | Acil poliklinik | - | - | - | 1 |
| | Beyin cerrahi polikliniği | - | 1 | - | - |
| Toplam | | 0 | 26 | 12 | 20 |

Acinetobacter kökenlerinde *bla*_{OXA-51like} geninin kromozomal olarak aktarıldığı düşünülmektedir. OXA-51 tipi enzim taşıyan izolatların zayıf karbapenemaz aktivitesi olduğu ve sefaloridin hariç sefalosporinlerin bu enzimden etkilenmediği düşünülmektedir. Çalışmamızda PCR ile *bla*_{OXA-51 like} geni tüm izolatlarda saptanmıştır.

Çalışmamızda klinik izolatların bir kısmında OXA enzim tipleri bir arada kodlandığı saptanmıştır. Ülkemizdeki diğer çalışmalarda oksasilinaz üreten *Acinetobacter* kökenlerinde aynı durum söz konusudur. Çalışmamızda PCR sonuçlarında 26 izolatta OXA-23 ve OXA-51 geninin birlikte kodlandığı, 32 izolatta OXA-58 ve OXA-51 geninin birlikte kodlandığı tespit edilmiştir. Üç izolatta ise OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 genleri bir arada saptanmıştır. OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 genlerinin birlikte kodlandığı PCR ile tespit edilen AB037 kodlu izolat moleküler yöntemlerden altın standart olarak kabul edilen DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiş ve AB037 kodlu izolatın üç oksasilinaz enzim genini de taşıdığı doğrulanmıştır.

Tedavi stratejilerini belirlerken mevcut antimikrobiyal ajanların kullanımını optimize etmek, ilaçlara gelişen direnç mekanizmaları açısından çok önemlidir. Eğer mümkünse hastane ortamında endemik *A. baumannii* izolatlarının fenotipik ve genotipik olarak kurumsal düzeyde epidemiyolojik verilerinin bulunması ampirik tedavilerde, antibiyotik seçiminde yönlendirici olabilir. İn vitro duyarlılık testlerinin

verileri, küçük vaka serileri ve gözlemsel retrospektif çalışmaların analizini yapmak en iyi tedavi yaklaşımları için önemlidir.

Moleküler çalışmalarla OXA enzim varlığı tespit edilen ABC kan izolatları hastanemizde en çok YBÜ' lerinden izole edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda ABC izolatlarının antimikrobiyal ajanlara direnç oranı yıllara göre artış göstermiştir. OXA tiplerinin bu izolatlarda bir arada bulunması izolatlar arasında horizontal direnç aktarımını akla getirmektedir. İzolatların aralarındaki klonal ilişkiyi PFGE gibi epidemiyolojik metodlarla belirlenmesi epideminin kaynağının bulunması, alınacak önlemlerin belirlenmesi ve *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu epideminin sonlandırılması açısından büyük önem taşımaktadır.

8. SONUÇLAR

Ocak 2007-Aralık 2009 tarihleri arasında 158 hastanın kan kültürü klinik örneklerinden izole edilerek etken olarak rapor edilmiş ABC izolatlarından imipenem ya da meropenemden birine; orta duyarlı veya dirençli saptanmış olan 74 izolatta karbapenemaz varlığının fenotipik ve moleküler metodlarla belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. ABC izolatlarının %77.03' ü yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ), %20' si servislerden, % 2.7' si polikliniklerden izole edildi.
2. ABC izolatların tümünün hastaneye yatış sonrası gelişen hastane enfeksiyonları etkeni olarak saptandı.
3. Kombine disk testiyle 4 izolatta fenotipik olarak karbapenemaz üretimi saptandı. Modifiye hodge testi ile ise sadece 1 izolatta karbapenemaz üretimi saptandı. İki test arasındaki uyum %93.24 olarak belirlendi.
4. PCR ile izolatlarda MBL genlerinden hiçbiri saptanamadı.
5. PCR ile tüm izolatlarda OXA-51, 26 izolatta OXA-23, 32 izolatta OXA-58 geni saptandı. Üç izolatta ise OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 genleri bir arada tespit edildi.
6. OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 genlerinin bir arada varlığı DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanmıştır.
7. Hastanemizde kan örneklerinden izole edilen ABC izolatlarında oksasilinaz genleri PCR analizi ile saptandı. Hastane ortamında dirençli izolatların yayılmasını önlemek oldukça önemlidir. Kan akımı enfeksiyonlarına sebep olan ABC izolatlarında karbapenemaz tespit edilmesi ve moleküler yöntemlerle doğrulanması hastane içindeki dirençli izolatların yayılımının önlenmesine yönelik çalışmalarda ve doğru antimikrobiyal tedavinin seçilmesinde yönlendirici olacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Towner KJ (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 73: 355-63.
2. Gerischer U (2008). *Acinetobacter* Molecular Biology. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* 11: 147-150.
3. Bergogne Berezin E, Towner KJ (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 148-165.
4. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538-582.
5. Prashanth K, Badrinath S (2005). Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. [Comparative Study]. *Indian J Med Res* 122: 408-418.
6. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 8. baski kitabından. 750-1, ASM Press, Washington, DC (2003).
7. Hanlon GW (2005). The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Lett Appl Microbiol* 41: 375-8.
8. Somerville DA, WC Noble (1970). A note on the gram-negative bacilli of human skin. *Eur J Clin Biol Res* 40: 669-670.
9. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 32: 106-19.
10. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A, Towner KJ (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 11: 329-32.
11. Romanelli RM, Jesus LA, Clemente WT, Lima SS, Rezende EM, Coutinho RL, Moreira RL, Neves FA, Brás Nde J (2009). Outbreak of resistant *Acinetobacter baumannii* measures and proposal for prevention and control. *Braz J of Infect Dis* 13: 341-7.

12. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 35: 2819–2825.
13. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T (1999). Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 179-183.
14. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 35: 1394-1397.
15. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 38: 25-33.
16. Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, Ikonomidis A, Koutsoukou A, Pournaras S, Tsakris A (2008). Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29: 410-417.
17. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36: 1938-1941.
18. Gaddy JA, Actis LA (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 4: 273-278.
19. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 14: 49–54.
20. Joly Guillou ML (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 11: 868–873.
21. Aşık G (2011). *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul* 45: 371-380.
22. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, Yamamoto S (2004). Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore

- produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. Microbiology 150: 2587-97.
23. Agodil A, Zarrilli R, Barchitta M, Anzaldi A, Di Popolo A, Mattaliano A, Ghiraldi E, Travali S (2006). Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital. Clin Microbiol Infect 12: 241-247.
 24. Wisplinghoff H, W Perbix, H Seifert (1999). Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. Clin Infect Dis 28: 59-66.
 25. Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, Lim JE, Lee SK, Lee SH, Lee KJ, Kang YA, Kim SK, Chang J, Kim YS (2010). Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. BMC Infect Dis 10: 228.
 26. Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N (2006). Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 27: 647-653.
 27. Saltoğlu N (2007). *Acinetobacter baumannii* İnfeksiyonları ve Tedavisi. Klimik 2007 XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Adana, 204-207.
 28. D'Agata EM, Thayer V, Schaffner W (2000). An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. Infect Control Hosp Epidemiol 21: 588-91.
 29. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM (1996). CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed.: APIC Infection Control and Applied Epidemiology: Principles and Practice. St. Louis: Mosby A-1-A-20.
 30. Falagas ME, Karveli EA (2007). The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. Clin Microbiol Infect 13: 117-9.
 31. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H (2000). Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in

- United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 31: 690-7.
32. Park DR (2005). The Microbiology of Ventilator-Associated Pneumonia. *Respiratory Care* 50: 742-765.
 33. Lynch JP (2001). Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 119: 373-384.
 34. Gaynes R, Edwards JR (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis* 41: 848–854.
 35. Restrepo MI, Anzueto A (2009). The role of gram-negative bacteria in healthcare-associated pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 30: 61-6.
 36. Tasbakan MS, Bacakoğlu F, Başoğlu OK, Gürgün A, Başarık B, Citim Tuncel S, Sayiner A (2011). The comparison of patients with hospitalized health-care-associated pneumonia to community-acquired pneumonia. *Tuberk Toraks* 59: 348-54.
 37. Restrepo MI, Anzueto A (2009). The role of gram-negative bacteria in healthcare-associated pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 30: 61-6.
 38. Ho PL, VC Cheng, CM Chu (2009). Antibiotic resistance in community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 136: 1119-27.
 39. Cisneros JM, Rodriguez Bano J (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8: 687-93.
 40. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309-17.
 41. Sheng, WH, Liao CH, Lauderdale TL, Ko WC, Chen YS, Liu JW, Lau YJ, Wang LH, Liu KS, Tsai TY, Lin SY, Hsu MS, Hsu LY, Chang SC (2010). A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis* 14: 764-9.

42. Seifert H, Strate A, Pulverer G (1995). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 74: 340-9.
43. Beck Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, Culver DH, Potts A, Gay E, Shotts BW, Hill B, Anderson RL, Weinstein MP (1990). Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am. J. Epidemiol* 132: 723–733.
44. Rodriguez Guardado A, Blanco A, Asensi V, Pérez F, Rial JC, Pintado V, Bustillo E, Lantero M, Tenza E, Alvarez M, Maradona JA, Cartón JA (2008). Multidrug-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. *J Antimicrob Chemother* 61: 908-13.
45. Tuon FF, Penteadó-Filho SR, Amarante D, Andrade MA, Borba LA (2010). Mortality rate in patients with nosocomial *Acinetobacter* meningitis from a Brazilian hospital. *Braz J Infect Dis* 14: 437-40.
46. Siegman Igra Y, Bar Yosef S, Gorea A, Avram J (1993). Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 17: 843-9.
47. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5: 939-51.
48. Menon T, Shanmugasundaram S, Nandhakumar B, Nalina K, Balasubramaniam (2006). Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 49: 576–578.
49. Olut AI, Erkek E (2005). Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis* 37: 919–921.
50. Corrigan KM, Harmis NY, Willcox MD (2001). Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea* 20: 463–466.
51. Kau HC, Tsai CC, Kao SC, Hsu WM, Liu JH (2002). Corneal ulcer of the side port after phacoemulsification induced by *Acinetobacter baumannii*. *J Cataract Refract Surg* 28: 895–897.

52. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G, Schelotto F (2006). Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 44: 3838–3841.
53. Friedman O, Jassal SV, Bargman JM (2008). *Acinetobacter* peritoneal dialysis peritonitis: description and relation to the SPICE family of organisms. *Perit Dial Int* 28: 195-7.
54. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 353-9.
55. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB (1997). Comparative in vitro antimicrobial susceptibility of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrobial Agents Chemother*; 41: 881-885.
56. Rahal JJ (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*; 43: 95-99.
57. Bonapece CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA (2000). Evaluation of antibiotic sinerji against *Acinetobacter baumannii*: a comparison wit Etest, time-kill and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 38: 43-50.
58. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM (2004). Multi-resistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? *J Hosp Infect* 58: 167-169.
59. Maragakis LL, Perl TM (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* 46: 1254-63.
60. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H (2004). In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1586–92.
61. Seifert H, Stefanik D, Wisplinghoff H (2006). Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically

- defined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Antimicrob Chemother 58: 1099–100.
62. Pachon Ibanez ME, Jimenez Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J (2004). Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. Antimicrob Agents Chemother 48: 4479–81.
 63. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME (2008). Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. J Antimicrob Chemother 62: 45-55.
 64. Gordon NC, Wareham DW (2009). A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. J Antimicrob Chemother 63: 775-780.
 65. Ferrara AM (2006). Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents 27: 183-95.
 66. Livermore DM (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 8: 557-84.
 67. Drawz SM, RA Bonomo (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 23: 160-201.
 68. Bush K, GA Jacoby (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54: 969-76.
 69. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 3: 335-41.
 70. Queenan AM, Bush K (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 20: 440-58.
 71. Singh R, Saxena A, Singh H (2009). Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. J Biomed Sci 16: 109.
 72. Walther Rasmussen J, Hoiby N (2007). Class A carbapenemases. J Antimicrob Chemother 60: 470-82.

73. Walsh TR (2008). Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 21: 367-71.
74. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM (2011). Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 11: 381-93.
75. Nordmann P, Poirel L (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-31.
76. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P (2005). Metallo beta lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306-25.
77. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2: 501-12.
78. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM; ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS) (2007). Metallo beta lactamases as emerging resistance determinants in Gram negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 29: 380-8.
79. Maltezou HC (2009). Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 33: 405.
80. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR (2005). Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 55: 61-70.
81. Rasmussen BA, Bush K (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 223-32.
82. Bebrone C (2007). Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74: 1686-701.
83. Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1460-4.
84. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-

- lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 41: 5407-13.
85. Poirel L, Nordmann P (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12: 826-36.
 86. Towner KJ, Gee T, Boswell T (2002). An Unwanted Import to the UK: Carbapenem Resistant Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* Producing Metallo-Beta-Lactamase. *J.Antimicrob. Chemother* 50: 1092-1093.
 87. Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, Palepou MF, Towner KJ, Livermore DM, Woodford N (2002). IMP-1 Carbapenemase Detected in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate From the UK. *J.Antimicrob* 49: 217-218.
 88. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM (1999). Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo beta lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 43: 1584-1590.
 89. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 891-7.
 90. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN (2006). VIM-1 metallo beta lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 12: 981-83.
 91. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P (2008). First identification of VIM-4 metallo beta lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 14: 289-90.
 92. Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH (2008). Molecular characterisation of the metallo beta lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 32: 475-80.
 93. Lin YC, Sheng WH, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Li SY (2010). Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 35: 439-43.

94. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, Chong Y (2002). Molecular characterization of metallo beta lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*VIM-2 gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 49: 837–40.
95. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y (2005). Novel acquired metallo beta lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4485–91.
96. Dwivedi M, Mishra A, Azim A, Singh RK, Baronia AK, Prasad KN, Dhole TN, Dwivedi UN (2009). Ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* carrying multiple metallo beta lactamase genes. *Indian J Pathol Microbiol* 52: 339–42.
97. Lee K, Kim CK, Hong SG, Choi J, Song S, Koh E, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y (2010). Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter genomospecies* 10 carrying two different metallo-beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 36: 259-63.
98. Lee JY, Lim MH, Heo ST, Ko KS (2012). Repeated isolation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to both polymyxins and carbapenems from 1 patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72: 267-71.
99. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR (2004). Molecular characterization of a beta lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo beta lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4654–61.
100. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo beta lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 50: 673–9.
101. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Goncalves AL, Barth AL (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo beta lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 56: 1148–51.

102. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N (2011). Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol* 3: 68-74.
103. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H (2001). Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta lactamase fold. *FEBS Lett* 503: 1-6.
104. Toney JH, Moloughney JG (2004). Metallo-beta-lactamase inhibitors: promise for the future? *Curr Opin Invest Drugs* 5: 823–6.
105. Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, Concha NO, Janson CA, Gilpin M, Bateson JH, Cheever C, Niconovich NL, Pearson S, Rittenhouse S, Tew D, Diez E, Perez P, De La Fuente J, Rees M, Rivera-Sagredo A (2002). Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 1880-1886.
106. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC (2008). Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 46: 2028-37.
107. Yana JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC (2004). Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo B-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49: 5–11.
108. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995). A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211–1233.
109. Poirel L, Marque S, He´ritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P (2005). OXA-58, a novel class D beta lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 49: 202–208.
110. Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 24-38.
111. Walther Rasmussen J, Hoiby N (2006). OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57: 373-83.

112. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 196-9.
113. Bou G, Oliver A, Martinez Beltran A (2000). OXA-24, a novel class D beta lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1556–1561.
114. He´ritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 268–273.
115. Poirel L, Marque´ S, He´ritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P (2005). OXA-58, a novel class D beta lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 202–208.
116. He´ritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P (2005). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4174–4179.
117. <http://www.bd.com/ds/>
118. O’Hara CM (2006). Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for Identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and Commonly Isolated Nonenteric Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 8: 933
119. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Tests; Approved Standards-Ninth Edition (2006). Clinical and Laboratory Standarts Institute Document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
120. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informatinal Supplement (2007). CLSI document M100- S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

121. Pitout JD, Egson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 43: 3129-35.
122. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo beta lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect. Dis* 7: 88-102.
123. Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC (2009). Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of non fermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res* 129: 707-12.
124. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A (2011). Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 49: 4301-3.
125. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S (2007). Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 45: 544–547.
126. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ (2001). Metallo beta lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2224–2228.
127. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB & Livermore, DM (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27: 351–353.
128. Kempf M, Rolain JM (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39: 105-14.
129. Leblebicioglu H, Cakir N, Celen M, Kurt H, Baris H, Laeuffer J; Turkish COMPACT Study Group (2012). Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. *BMC Infect Dis* 12: 42.

130. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, Spellberg BJ, Rhee D, Halstead DC, Pasculle AW, Doi Y (2011). Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol* 49: 3849-54.
131. Garcia Rodriguez JA, Jones RN, MPS Group (2002). Antimicrobial resistance in gram-negative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programme. *J Chemother* 14: 25-32.
132. Zarakolu P, Hascelik G, Unal S (2006). Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004). *Mikrobiyol Bul* 40: 147-54.
133. Turner PJ (2008). Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 185–92.
134. Patzer JA, Dzierzanowska D, Turner PJ (2008). Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a paediatric intensive care unit in Warsaw: results from the MYSTIC programme (1997-2007). *J Antimicrob Chemother* 62: 369-75.
135. Bedenic B, Goic-Barisic I, Budimir A, Tonkic M, Mihajkevic LJ, Novak A, Sviben M, Plecko V, Punda-Polic V, Kalenic SI (2010). Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of selected gram-negative bacilli from two Croatian hospitals: MYSTIC study results. *J Chemother* 22: 147-52.
136. Nordmann P, Picazo JJ, Mutters R, Korten V, Quintana A, Laeuffer JM, Seak JC, Flamm RK, Morrissey I; COMPACT study group (2011). Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. *J Antimicrob Chemother* 66: 1070-8.
137. Oh E, Lee S, Park Y, Park J, Park K, Kim S, Kang M, Kim B (2003). Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J Microbiol Methods*. 54: 411-418.
138. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing

- clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 40: 3798-801.
139. Franklin C, Liolios L, Peleg AY (2006). Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 44: 3139-44.
140. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V (2005). Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res 21: 780-3.
141. Irfan S, Zafar A, Guhar D, Ahsan T, Hasan R (2008). Metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit patients of a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol 26: 243-5.
142. Hu Q, Hu Z, Li J, Tian B, Xu H, Li J (2011). Detection of OXA-type carbapenemases and integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in China. J Basic Microbiol 51: 467-72.
143. Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S (2008). Hidden VIM-1 metallo-beta-lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol 46: 346-9.
144. Karthika Uma R, Srinivasa Rao R, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K (2009). Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. J Med Microbiol 58: 430-5.
145. Seli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Ardoğan B (2009). *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 23: 51-55.
146. Çıkman A, Berктаş M, Bektaş A, Özkaçmaz A, Yaman G (2011). Nozokomiyal *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. Van Tıp Dergisi 18: 132-135.
147. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ, Karahan ZC, Baran I, Kurşun Ş (2011). İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz

- Üretiminin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 44: 29-36.
148. Eser OK, Ergin A, Hascelik G (2009). Antimicrobial resistance and existence of metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species isolated from adult patients. Mikrobiyoloji bulteni 43: 383-90.
 149. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y (2003). Evaluation of the Hodge Test and Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase- Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol 41: 4623- 4629.
 150. Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM (2009). Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. Yonsei medical journal 50:764-70.
 151. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy 49:3198-3202.
 152. Kohlenberg A, Brummer S, Higgins PG, Sohr D, Piening BC, Grahl de C, Halle E, Ruden H, Seifert H (2009). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. Journal of medical microbiology 58:1499-1507.
 153. Basustaoglu A, Uskudar Guclu A, Bedir O, Kilic A (2012). An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem hydrolysing oxacillinases in an intensive care unit in Turkey. 22nd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 31 Mart 2012 - 03 Nisan 2012.
 154. Nordmann P (2010). Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. Medecine sciences 26: 950-9.
 155. Kaase M, Pfennigwerth N, Szabados F, Gatermann S (2012). First description of the metallo-betalactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii* (formerly *Acinetobacter genomospecies 3*). 22nd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 31 Mart 2012 - 03 Nisan 2012.
 156. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM

- (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS genetics 2: 62-72.
157. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Medigue C, Weissenbach J, Cruveiller S (2008). Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. PloS one 3:e1805.
 158. Kresken M, Becker K, Seifert H, Leitner E, Körber-Irrgang B, von Eiff C, Loschmann PA (2011). Resistance trends and in vitro activity of tigecycline and 17 other antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative organisms, including multidrug-resistant pathogens, in Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30: 1095–103.
 159. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D, Nordmann P, Glupczynski Y (2006). Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. Journal of clinical microbiology 44: 4189-92.
 160. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P (2005). Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. Journal of clinical microbiology 43: 4885-4888.
 161. Souli M, Galani I, Giamarellou H (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill 13: 1-11.
 162. Dessel van H, Dijkshoorn L, Reijden van der T, Bakker N, Paauw A, Broek van den P, Verhoef J, Brisse S (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Research in microbiology 155: 105-112.
 163. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN (2009). 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. The Journal of antimicrobial chemotherapy 63: 55-59.

164. He C, Xie Y, Zhang L, Kang M, Tao C, Chen Z, Lu X, Guo L, Xiao Y, Duo L, Fan H (2011). Increasing imipenem resistance and dissemination of the IS*Abal*-associated *bla*_{OXA-23} gene among *Acinetobacter baumannii* isolates in an intensive care unit. *Journal of medical microbiology* 60: 337-341.
165. D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P (2011). Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66: 54-61.
166. Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A (2006). Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents* 28: 376-377.
167. Kim, YJ, Kim SI, Kim YR, Hong KW, Wie SH, Park YJ, Jeong H, Kang MW. (2012). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiology and infection* 140: 137-145.
168. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolayli F, Eroglu C (2006). High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58: 537-542.
169. Meric M, Kasap M, Gacar G, Budak F, Dundar D, Kolayli F, Eroglu C, Vahaboglu H (2008). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. *FEMS microbiology letters* 282: 214-218.
170. Deniz G, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M (2008). 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* 57: 1529–1532.
171. Ozen N, Ergani A, Naas T, Ögünç D, Gültekin M, Colak D, Nordman P (2009). Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenemase OXA-58 in Turkey. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 1: 1-8.

172. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC, Savelkoul PH (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. International journal of antimicrobial agents 36: 114-118.
173. Aktaş Z, Kayacan C, Oncul O (2012). In vitro of avibactam (NXL104) in combination with beta lactamas against Gram-negative bacteria, including OXA-48 beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Antimicrobial Agents 39: 86– 89.
174. Ergin A, Köseoglu Eser Ö, Haşçelik G (2012). Investigation of repetitive PCR results and diversity of oxacillinases among invasive *Acinetobacter baumannii* isolates through six years (2004-2010) in a Turkish university hospital. 22nd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 31 Mart 2012 - 03 Nisan 2012.

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı : 742
Konu:

Tarih: 26.10.2011

Sayın; Arş.Gör.Gülşen ULUÇAM
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD.

"Metallo-Beta-Laktamaz Üreten Klinik *Acinetobacter baumannii* Complex İzolatlarının Epidemiyolojik Analizi" başlıklı etik kurul 2011/121 no'lu tez çalışmasının raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

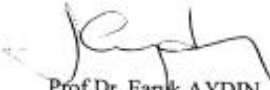

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

| | | | |
|--|---|--|---|
| <p>Çalışmanın Adı: "Metallo-Beta-Laktamaz Üreten Klinik <i>Acinetobacter baumannii</i> Complex İzolatlarının Epidemiyolojik Analizi"</p> <p>Çalışmacılar: Arş.Gör.Gülşen ULUÇAM, Y.Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU, Doç.Dr.İlknur TOSUN, Doç.Dr.Neşe KAKLIKKAYA, Prof.Dr.Faruk AYDIN</p> <p>Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji ABD.</p> | | | |
| <p>Etik Kurul Dosya No 2011/121</p> | <p>Etik Kurul Toplantı Tarihi 24.10.2011</p> | <p>Etik Kurul Toplantı No 2011/26</p> | <p>Etik Kurul Karar No 4</p> |
| <p>Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Faruk AYDIN'ın başkanlığında "Metallo-Beta-Laktamaz Üreten Klinik <i>Acinetobacter baumannii</i> Complex İzolatlarının Epidemiyolojik Analizi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (24.10.2011)</p> <p>Başvuru Tarihi: 10/06/2011</p> <p> Prof.Dr. Faruk AYDIN</p> <p>Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı Tıbbi Mikrobiyoloji ABD</p> | | | |

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı: B302KTÜ0200000/ 428
Konu:

Tarih: 07.05.2012

Sayın: Y.Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD.

Sorumluluğunuzda yürütülen Arş.Gör.Gülşen ULUÇAM'a ait "Metallo-Beta-Laktamaz Üreten Klinik *Acinetobacter baumannii* Complex İzolatlarının Epidemiyolojik Analizi" başlıklı 2011/121 no'lu daha önce onay almış olan tez çalışması ile ilgili etik kurul'a sunmuş olduğunuz 30/03/2012 tarihli dilekçede belirtilen nedenlerden dolayı çalışma başlığının "*Acinetobacter baumannii* Complex Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması" olarak değiştirilmesi; bilimsel ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim ederim.


Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport : 24745583604
Soyadı, Adı : ULUÇAM, Gülşen
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 29/04/1985, ANKARA
Medeni hali : Bekar
Telefon : 505 397 23 09
Faks :
E-Posta : gulsenulucam85@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD

EĞİTİM BİLGİLERİ

| Derece | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Doktora/Uzmanlık | : | |
| Yüksek Lisans | : KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD | 2012 |
| Lisans | : Abant İzzet Baysal Üniversitesi | 2009 |
| Lise | : Eryaman Lisesi | 2003 |

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

| Görevi | Kurum | Süre(Yıl-Yıl) |
|------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1. Araştırma görevlisi | KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD | 2009-halen |

YABANCI DİL

İngilizce