

**T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANEMİZ YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU
İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER* VE *PSEUDOMONAS* İZOLATLARINDA
METALLOBETALAKTAMAZ (MBL) VARLIĞININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Cennet RAĞBETLİ
Uzmanlık Tezi**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU**

VAN – 2016

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HASTANEMİZ YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU
İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER* VE *PSEUDOMONAS* İZOLATLARINDA
METALLOBETALAKTAMAZ (MBL) VARLIĞININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Cennet RAĞBETLİ
Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

VAN – 2016

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2014-TF-U109 proje olarak desteklenmiştir. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 04.04.2014 tarih B.30.2.YYU.0.01.00.00/29 nolu kararı ile çalışmaya başlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
KISALTMALAR	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Non Fermantaif Gram Negatif Bakteriler.....	3
2.1.1. <i>Acinetobacter</i> Cinsi.....	3
2.1.2. <i>Pseudomonas</i> Cinsi	7
2.2. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları ve Sınıflandırılması	9
2.3. Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları	14
2.3.1. Doğal Direnç	14
2.3.2. Çevreye Bağlı Direnç.....	14
2.3.3. Kazanılmış Direnç.....	14
2.4. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	16
2.4.1. İlacın Hedef Bölgesindeki Değişiklikler.....	16
2.4.2. Dış Membran Geçirgenliğinin Bozulması	16
2.4.3. Beta-Laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi	16
2.5. Beta-laktamazlar	17
2.5.1. Grup 1 (Amp C) Beta-Laktamazlar	19
2.5.2. Grup 2 Beta-Laktamazlar.....	20
2.5.3. Grup 3 Beta-Laktamazlar.....	22
2.5.4. Grup 4 Beta-Laktamazlar.....	35
2.6. Karbapenemlere direnç mekanizmaları	35
2.6.1. İlacın hücrede etkin konsantrasyona ulaşamaması	35
2.6.2. Karbapenemazlar: Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı....	36
2.6.3. Hedef PBP Değişimleri	37
2.7. Hastane Enfeksiyonlarında Moleküler Mikrobiyolojinin Önemi	37

3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Örneklerin toplanması	39
3.2. Klinik örneklerden bakteri idendifikasyonu	39
3.3. Kullanılan besiyerleri.....	39
3.4. Antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi	40
3.5. Fenotipik yöntemler ile MBL üretiminin doğrulanması.....	41
3.5.1. Kombine Disk Testi ile MBL üretiminin doğrulanması	41
3.5.2. Çift Disk Sinerji Testi ile MBL üretiminin doğrulanması	42
3.5.3. Modifiye Hodge Testi ile MBL üretiminin doğrulanması	42
3.6. Genotipik Yöntemlerle Karbapenemazların Saptanması.....	42
3.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	42
3.6.2. <i>P. aeruginosa</i> ve <i>A. baumannii</i> PFGE Protokolü	45
3.7. İstatistiksel Analiz	49
3.8. Çalışma Onayı	50
4. BULGULAR	51
4.1. Örnek türleri ve izolatların özellikleri	51
4.2. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık sonuçları	52
4.3. Fenotipik testlerle MBL Üretiminin Doğrulanması	55
4.3.1. Kombine Disk Testi	55
4.3.2. Çift Disk Sinerji Testi	56
4.3.3. Modifiye Hodge Testi	56
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sonuçları	57
4.5. Fenotipik Yöntemlerin PZR ile Uyumunun Karşılaştırılması	60
4.6. <i>A. baumannii</i> izolatlarının PFGE Sonuçları	62
4.7. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE Sonuçları	63
5. TARTIŞMA	66
6. KAYNAKLAR	74
7. ÖZGEÇMİŞ	93

TEŞEKKÜR

Eğitim sürecimde bize huzurlu bir iç ortamı sağlayan hoşgörsü, tecrübesi ve bilgisinden yararlandığım bölüm başkanımız ve danışman hocam Doç. Dr. Hüseyin Güdücüoğlu'na,

Uzmanlık eğitimim sırasında her türlü destek, bilgi, tecrübe ve yardımlarını bizden esirgemeyen Doç. Dr. Yasemin Bayram ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Parlak hocalarıma,

Çalışmamda desteklerini gördüğüm başta Suat Özlük ve Mustafa Aden olmak üzere tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma.

Bu tezin moleküler analizlerinin her aşamasında destek, yardım ve yönlendirmelerinden faydalandığım Malatya İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarından başta Doç. Dr. Barış Otlu ve Uzm. Dr. Canan Gürsoy olmak üzere tüm çalışanlarına,

Ayrıca asistanlık eğitimimin ilk yılını geçirdiğim Dışkapı Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına,

Çalışmamın mali ayağında destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığına,

Beni yetiştiren ve hayatım boyunca yanımda olan aileme; desteği, sonsuz sabrı ve fedakarlıkları ile hep yanımda olan değerli eşim Prof. Dr. Murat Çetin Rağbetli ve kızım Zeynep Rağbetli ile oğlum Mustafa Rağbetli'ye teşekkür ederim.

KISALTMALAR

- 7-APA:** 7-Amino Sefalosporanik Asit
ATCC: American Type Culture Collection
BL: Beta Laktamaz
CAZ: Ceftazidim
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD: Çoklu İlaç Direnci
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EMB: Eozin Metilen Blue
GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
IMP: İmipenem
IRT: İnhibitör Rezistant TEM beta laktamaz
İKA: İnsan Kanlı Agar
MBL: Metallo Beta-Laktamaz
MHA: Mueller Hinton Agar
MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MPA: Merkuptoasetik Asit
OMP: Dış Membran Proteinleri
PBP: Penisilin Bağlayan Protein
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SENIC: Study on the Efficacy of Nasocomial Infection Control
SENTRY: Antimicrobial Surveillance Program
SHV: Sulfhydryl-Variable
SMA: Sodyum merkuptoasetik asit
TEM: Temoniera
TSI: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi
VIM: Veronese İmipenemaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PFGE sonuçları.....	63
Şekil 2:	<i>Acinetobacter baumannii</i> PFGE sonuçları.....	64



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:	Pozitif Kombine Disk Testi	27
Resim 2:	Pozitif Çift Disk Sinerji Testi.....	27
Resim 3:	Pozitif Gradyent Testi.....	28
Resim 4:	Pozitif Modifiye Hodge Testi.....	29
Resim 5:	Kombine Disk Testi Pozitifliğinin Görünümü.....	54
Resim 6:	Çift Disk Sinerji Testi Pozitifliğinin Görünümü.....	55
Resim 7:	Modifiye Hodge Testi Pozitifliğinin Görünümü.....	56
Resim 8:	SPM Pozitif Gen Bölgeleri <i>A. baumannii</i>	57
Resim 9:	OXA-51 Pozitif Gen Bölgeleri <i>A. baumannii</i>	58
Resim 10:	OXA-23 Pozitif Gen Bölgeleri <i>A. baumannii</i>	58
Resim 11:	OXA-10 Pozitif Gen Bölgeleri <i>P. aeruginosa</i>	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1:	<i>Acinetobacter baumannii</i> 'de CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler.....	6
Tablo 2:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler.....	9
Tablo 3:	Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri	
Tablo 4:	Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması.....	21
Tablo 5:	<i>Acinetobacter baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> için zon çapı ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) standartları.....	39
Tablo 6:	TopTaq (Qiagen)PZR reaksiyon karışımının hazırlanması.....	42
Tablo 7:	PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler.....	43
Tablo 8:	Elde edildikleri birimlere göre izolatların ve örnek türlerinin dağılımı	50
Tablo 9:	<i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	51
Tablo 10:	<i>A. baumannii</i> için antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	52
Tablo 11:	<i>P. aeruginosa</i> için antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	53
Tablo 12:	İzolatlara göre KDT sonuçlarının dağılım yüzdesi.....	54
Tablo 13:	İzolatlara göre ÇDST sonuçlarının dağılım yüzdesi.....	55
Tablo 14:	İzolatlara göre MHT sonuçlarının dağılım yüzdesi.....	56
Tablo 15:	PZR ile pozitiflik saptanan gen bölgelerinin izolatlara göre dağılımı...	57
Tablo 16:	Kombine Disk Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması.....	60
Tablo 17:	Çift Disk Sinerji Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması.....	60
Tablo 18:	Modifiye Hodge Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması.....	61
Tablo 19:	Fenotipik testlerin PZR'deki tüm genlere göre dağılımı.....	61

ÖZET

Yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) gelişen enfeksiyonlarda nonfermentatif bakterilerin görülme sıklığı artmaktadır. Birçok antibiyotiğe karşı dirençli oldukları bilinen bu bakterilerde karbapenemlere de yüksek oranda direnç gözlenmektedir. Çalışmada, YBÜ'deki hastalardan izole edilen nonfermentatif bakterilerde karbapenem direncine neden olan Metallo Beta Laktamaz (MBL) varlığının fenotipik ve genotipik analizler ile belirlenerek Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ile izolatlar arası ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Nisan 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun Odabaş Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarında imipenem veya meropenem dirençli 51 *Acinetobacter baumannii* ve 51 *Pseudomonas aeruginosa* izolatu çalışmaya dâhil edilmiştir. İzolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile belirlenmiştir. MBL varlığı, çift disk sinerji testi (ÇDST), kombine disk testi (KDT), Modifiye Hodge testi (MHT) ile tespit edilmiştir. Tüm izolatlarda karbapenem direncine yol açan IMP, VIM, GES, GIM, SPM, OXA-10, OXA-23 ve OXA-51 gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiştir. Ayrıca tüm izolatlarda pulse field gel electrophoresis (PFGE) ile klonal ilişki ortaya konmuştur.

Toplam 102 izolatu hiç birinde IMP, VIM, GES, GIM gen bölgeleri tespit edilmemiştir. *A. baumannii* izolatlarının tamamında en az bir gen bölgesi pozitif olmak üzere %98'i OXA-51, %77'si OXA-23 ve %4'ünde SPM geni pozitif bulunmuştur. Bu izolatlarda; %77 oranında OXA-23 ile OXA-51 ve %4 oranında OXA-23, OXA-51 ile SPM birlikteliği saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarında ise OXA-51 %18 ve OXA-10 ise %14 oranında tespit edilmiştir. *A. baumannii* için duyarlılığı en yüksek fenotipik test olarak KDT (%94.1) bulunmuştur. ÇDST'nin duyarlılığı % 0 olduğu ve MBL analizi için uygun bir fenotipik test olmadığı görülmüştür. *P. aeruginosa* için ise duyarlılığı en yüksek testler sırasıyla ÇDST (%93.7), KDT (%87.5) ve MHT (56.2) olarak bulunmuştur. PFGE yöntemi ile klonal ilişki analizi sonuçlarına göre *A. baumannii* izolatlarının kümeleşme oranı % 80 olarak belirlenirken *P. aeruginosa* da bu oran % 53 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, tüm izolatlarda ülkemizde daha önce bildirilen gen bölgeleri çalışmamızda da benzer olarak bulundu. Fenotipif testlerden *A. baumannii* için en uygun KDT bulunurken *P. aeruginosa* için ise ÇDST bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *A. baumannii*, *P aeruginosa*, metallobetalaktamaz



SUMMARY

Nonfermentative bacterias have increased gradually infections of the intensive Care Units. Nonfermentative bacterias are highly resistant to most of the antibiotics especially carbapenems. This study aimed that the phenotypic and genotypic tests were evaluated of screening MBL-producing nonfermentative bacterias of resistant to carbapenems in patients at our hospital's Intensive Care Units (ICU) and investigate the relationship between strains by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

In study, imipenem or meropenem resistant 51 *Acinetobacter baumannii* and 51 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were included at during April 2014 - December 2014 Microbiology Laboratory of Dursun Odabas Medical Center in Yuzuncu Yil University. Antimicrobial susceptibility testing of the isolates were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method and BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) automated system at intensive care units in our hospital. MBL presense was investigated by Double Disk Synergy Test (DDST), the Combined Disk Test (CDT) and Modified Hodge test (MHT). All strains that cause carbapenem resistance by IMP, VIM, GES, GIM, SPM, OXA-10, OXA-23 and OX-51 gene regions was determined with Polymerase Chain Reaction (PCR). PFGE was used to investigate of the clonale relationship.

The highest specificity is determined by MHT. IMP, VIM, GES, GIM gene regions have not been detected of of PCR evaluation in any of totaly 102 isolates. The genes of OXA-51 (98 %), OXA-51 (77 %), OXA-23 (77%) and SPM (4 %) were found in *A. baumannii* isolates. In these strains, We identified together with OXA-23&OXA-51 % 77 and OXA-23&OXA-51&SPM % 4 genes. The genes of OXA-51 (18 %) and OXA-10 (14 %) detected in *P. aeruginosa* isolates. CDT (% 94) was found to be most sensitive for *A. baumannii*. DDST sensitivity was found 0 % for MBL analysis and it wasn't suitable analysis of phenotypic assays. Respectively DDST (94%), CDT (88 %) and MHT (56 %) sensitivity was found to be highest sensitivity for the *Pseudomonas aeruginosa*. According to PFGE clonal analysis results determined of clustering rate of *A. baumannii* 80 % and *P. aeruginosa* isolates were 53 %. For most of our hospital carbapenem resistance was found to be responsible for production of MBL.

As a result, in all regions of the gene are found similarly as previously reported in our country's study, but the OX-48 gene was detected firstly.

Key Words: *A. baumannii*, *P aeruginosa*, metalloβ-lactamase.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotik direnci yaygın ve kontrolsüz antibiyotik kullanımına bağlı olarak günümüzde büyük bir sorun haline gelmiştir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde sıkça görülen hastane enfeksiyonlarında çoklu ilaç direnci (ÇİD) belirlenen mikroorganizmalar daha çok önem kazanmıştır. Nonfermentatifler genellikle doğada saprofit konumunda yaygın olarak rastlanmakla birlikte, immun sistemi baskılanmış bireylerde ve uzun süreli antibiyotik kullanımının yaygın olduğu yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen mikroorganizmalardır. Bu ünitelerde hastalık etkeni olarak en sık izole ettiğimiz nonfermentatifler *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarıdır. Bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı direncin artması tedavide güçlükler sebeptir. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından 1974 yılında başlatılan geniş kapsamlı SENIC (Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control) projesinde enfeksiyon kontrol programlarının uygulandığı hastanelerde hastane enfeksiyonu hızında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Dirençli nonfermentatif mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar mortalitenin artmasına, hastane yatış süresinin uzamasına ve tedavi maliyetinde artışlar gibi sorunlara sebep olmaktadır (1,2).

Mikroorganizmalarla mücadelede Beta laktam antibiyotikler günümüzde stratejik tedavi seçeneği olarak önemini korumaktadır. Bu antibiyotikler 'penisilin bağlayıcı proteinler' olarak adlandırılan (PBP) enzimler üzerine etkili olarak bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkili olurlar. Bakterilerde beta laktam antibiyotiklere karşı gözlenen direnç; PBP'lerde görülen değişiklikler, beta laktamaz enzimleri ve permeabiliteye bağlı olarak gerçekleşebilir. Beta laktamazlar her bakteride görülmekle beraber gram negatiflerde arasında daha önemlidir. Gram negatiflerin en önemli antibiyotik direnç mekanizması beta laktamazlardır. Bunlardan en önemlileri: Geniş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL), Kromozomal İndüklenebilir Beta Laktamazlar (IBL), Karbapenemazlar (3).

Karbapenemler, penisilin ve sefalosporin gibi beta laktamlara rezistan bakteri türlerinin çoğuna karşı etkilidir. Özellikle ÇİD gram negatiflerin yol açtığı

enfeksiyonlarda oldukça iyi bir tedavi seçeneğidir. Ama son yıllarda özellikle nonfermantatif gram negatif bakteriler arasında karbapenemlere karşı artan bir direnç problemi gözlenmektedir. Ülkemizde olduğu gibi hastanemizde de izole edilen bakterilerde ÇİD artışı oldukça ciddi bir sorun olmaya başlamıştır (4,5).

Bu çalışmada hastanemiz Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda en sık rastlanan nonfermentatiflerden *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında ÇİD gelişimine sebep olan MBL direnci fenotipik ve genotipik analizlerle ortaya konulmasını amaçlanmıştır. Çeşitli materyallerden izole edilen 51 adet *Pseudomonas* ve 51 adet *Acinetobacter* izolatlarında Metallo Beta Laktamaz (MBL) aktivitesini çeşitli fenotipik yöntemlerle tespit ederek, bu yöntemlerin altın standart olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile uyumu karşılaştırılmıştır. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ile de klon analizi yapılarak izolatlar arası ilişki ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Fermantaif Gram Negatif Bakteriler

Nonfermentatif basiller, karbonhidratları enerji kaynağı olarak, fermentasyon dışındaki metabolik yollarla kullanan aerobik, sporsuz bakterilerdir. Klinikte karşılaşılan bakterilerin çoğu metabolik yollarında karbonhidratları kullanarak enerji elde ederler. İnfeksiyon hastalıkları etkeni olabilen bakterilerin identifikasyonu için de çeşitli metabolik ürünlerin tespit edilmesi ve ölçümü kullanılmaktadır. Nonfermentatifler, doğada yaygın olarak toprakta ve suda bulunmakla birlikte, hastane ortamı florasında da sık rastlanan bakteri grubunu oluşturmaktadır. İnsanlarda deri, solunum yolu ve oral florada da bulunabilmektedirler (6,7).

Nonfermentatifler son yıllarda özellikle yoğun bakım ünitelerinde antibiyotik tedavisi alan hastalarda fırsatçı ajanlar olarak ciddi enfeksiyonlara yol açmaları nedeni ile karşımıza oldukça sık çıkmaktadırlar. Nonfermentatifler, intrinsik veya kazanılmış antibiyotik direncini taşımaya eğilimlidirler (8). Bu mikroorganizmalar arasında, dirençli izolatlarla oluşmuş enfeksiyonlarda kullanılan yeni antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin hızla artmakta olduğunu belirten çalışmalar oldukça kaygı vericidir. Nonfermentatif bakterilerin iyi bilinen iki üyesinden *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda septisemi, endokardit, intrakraniyal enfeksiyonlar, cerrahi alan enfeksiyonları, solunum sistemi, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları gibi bir çok nazokomiyal enfeksiyon tablolarına sebep olmaktadır (9,10).

2.1.1. *Acinetobacter* Cinsi

İlk kez 1911 yılında Beijerinck isimli araştırmacı tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoacetius* olarak isimlendirilmişlerdir. Brisou ve Pre'vot 1954'de benzer morfolojik özellikler gösteren bu mikroorganizmalar arasında bazılarının hareketsiz olduklarını göstermişler ve Yunanca hareketsiz anlamına gelen

'Akinetos' sözcüğünden türeyen '*Acinetobacter*' adını vermişlerdir (11,12,13). Baumann ve ark. 1968 yılında *Acinetobacter*'lerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak ortaya koymuşlardır (14).

Acinetobacter cinsi *Moraxellaceae* familyası içinde sınıflandırılmakta ve hareketsiz, oksidaz negatif, Gram negatif yaklaşık 1-1.5 µm×1.5-2.5 µm boyutlarında kokobasil bakterilerden oluşmaktadır. Oksidaz testi negatiftir. MacConkey besiyerinde genellikle ürer. Tabiatı yaygın olarak bulunmakta ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden de sık olarak izole edilebilmektedirler. *Acinetobacter* türleri vücudun nemli bölgelerinde flora elemanı olarak yer almaktadır (15). Normal sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derisinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları gösterilmiştir (16).

Son zamanlarda Afganistan, Irak ve Kuveyt bölgesinde yaralanarak hastaneye yatan 102 askerin kan kültürlerinde *A. baumannii* izole edilmiştir. Afganistan'dan dönen Kanadalı askerlerde de ÇİD *Acinetobacter spp.* bağlı ventilatör ilişkili pnömoni tanımlanmıştır. Yine Vietnam savaşında görev alan askerlerde ekstremitelerde yaralanmalarında en sık izole edilen Gram-negatif bakteri *A. baumannii* olmuştur. Bütün bu olgularda nemli ve kuru ortamda yaşayabildiği için *Acinetobacter* türlerinin çevresel kontaminasyon kaynaklı oldukları düşünülmüştür (17).

Hastanede takip edilen hastalarda taşıyıcılık oranı daha yüksek olup bunun nedeni çarpaz kontaminasyon ve hastane ortamının kaynak oluşturmasıdır. Yapılan çeşitli çalışmalarda özellikle de hastane salgınlarının olduğu dönemlerde yatan hastalarda boğaz taşıyıcılığı % 7-8 olarak tespit edilmiş ve trakeostomi sürüntülerinde ise % 45 oranında saptanmıştır (18).

Virulans potansiyelleri düşük olduğundan bağışıklık sistemi normal bireylerde enfeksiyon oluşturma potansiyelleri oldukça düşüktür. Asidik pH'da ve düşük ısılarda üreyebilmeleri yanında bilinen sitotoksin üretimleri yoktur. Hücre duvarının yapısında bulunan lipopolisakkaritlerin endotoksijenik özelliği çok iyi bilinmemektedir. *Acinetobacter* sepsislerinin semptomlarından bu endotoksinin *in vivo* üretimi sorumludur. Bakterinin insan organizmasında üreyebilmesi de önemli virulans faktörlerindedir. Bazı *Acinetobacter* türlerinin dış membran reseptörleri gibi sideroforları üretebildikleri tespit edilmiştir (19).

Acinetobacter türlerinin antibiyotiklere dirençli izolatlarının enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla saptandığı ve bu nedenle eradikasyonunda zorluklar yaşanan bir mikroorganizmadır (20). *Acinetobacter* izolatları genel olarak penisilin, ampisilin, sefalotin, kloramfenikole direnç prevalansı, bölgeden bölgeye hatta hastaneden hastaneye göre değişiklik göstermektedir. Artan oranlarda karşımıza çıkan direnç sorunu tedavi yaklaşımlarında en büyük problemimizdir (21).

A. baumannii'nin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri kromozom veya plazmid kontrolünde betalaktamaz enzimlerinin üretilmesidir (22). *A. baumannii*'nin ürettiği beta-laktamazlar arasında Ambler sınıflandırmasında A'da yer alan TEM-1, PER-1, VEB-1, SHV-12, TEM-116, TEM-92, CTX-M-2, CTX-M-43 gibi genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar önemli yer tutmaktadır. *A. baumannii* izolatları, Ambler sınıf A betalaktamazlar dışında Ambler sınıf C'de yer alan ve 'Acinetobacter Derived Cephalosporinases' (ADCs) olarak da bilinen AmpC enzimleri de üretmektedirler. *A. baumannii*'de bu enzimin aşırı derecede üretilmesinde 'ISAbal' adı verilen bir IS elementinin rolü olduğu ve bu element sayesinde geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç geliştiği bilinmektedir (23,24). *A. baumannii*, karbapenemazlar da üretmekte olup bunlar Ambler sınıf D'de yer alan OXA tipi beta-laktamazları, Ambler sınıf B'de yer alan metallo beta-laktamazları kapsamaktadır. OXA tipi beta-laktamazlar arasında OXA-23 benzeri, OXA-40 benzeri, OXA-58 benzeri, OXA-51 benzeri, OXA-69 benzeri, OXA-24 beta laktamazlar bulunmaktadır. Ayrıca penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize eden IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-11, VIM-1, VIM-2, SIM-1, IMP-12, IMP-9 yer almaktadır (20).

Günümüzde ürkütücü bir şekilde ÇİD *Acinetobacter* salgınları bildirilmektedir. Bu gibi durumlarda standart tedavi protokolleri halen tam olarak oturtulmamıştır. İn vivo ve invitro denemelerde başarılı bulunan çeşitli kombine tedavi seçenekleri kullanılmaktadır (19,21). *Acinetobacter* türlerinin tedavisinde karbapenemler ve kolistin kullanılmaktadır. Fakat karbapenemlere de direnç artışı elimizde tek seçenek olarak kolistini bırakmıştır. Nadir olmakla birlikte ne yazık ki kolistin dirençli izolatlar da izole edilmektedir (22,23). CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 1. *Acinetobacter baumannii*'de CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler

Antibiyotikler	CLSI
İmipenem/Meropenem	4/16
Ciprofloksasin	1/4
Levofloksasin	2/8
Amikacin	16/64
Gentamycin, Tobramycin	4/16
Netilmicin	8/32
Ampicillin-Sulbactam	8/32
Piperacillin-Tazobactam	16/128
Ticarcillin-Clavulonate	16/128
Ceftazidime, Cefepime	8/32
Ceftriaxone, Cefotaxime	8/64
Polymixine B, Colistin	2/4
Trimetoprim-Sulfamethoxazole	2/4
Doxycycline, Minocycline, Tetracycline	4/16

Acinetobacter türleri tüm dünyada olduğu gibi son yıllarda ülkemizde YBÜ'lerde de sıklıkla rastlanan patojenlerdendir. Özellikle çevrede yoğun ve uzun süreli bulunabilmesi kalıcı sorunlar yaratmasında başlıca etmenlerdendir. Klasik olarak kromozomal beta laktamazlar (AmpC) taşıyabildikleri Verona İmipenemase (VIM) ve İmipenemase (IMP) gibi karbapenemaz genlerini taşıyan ya da diğer mekanizmalar ile direnç kazanan kökenlerin sebep olduğu salgınlar bildirilmektedir. Oxasilinase (OXA) kaynaklı direnç ve bu izolatların yaptığı salgınlar da giderek önem kazanmaktadır (24).

2.1.2. *Pseudomonas* Cinsi

P. aeruginosa, 1850 yılında Sedillot isimli araştımacı tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. İlk olarak *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Piyosiyanın izolasyonu Lucke tarafından 1862'de yapılmıştır (25). *Pseudomonas* cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* ailesi icinde yer alan Gram negatif, nonfermentatif, sporsuz, polar flagellaları ile hareketli, aerobik düz veya hafif kıvrık, 0.5-0.8µm×1.5-3µm büyüklüğünde basillerdir. Çoğu, kanlı agarda beta hemolitiklidir ve bazı izolatlar nitrat ya da arginin kullanarak anaerob ortamda da üreyebilirler. *P. luteola* ve *P. oryzyhabitans* dışında oksidaz pozitiflerdir. En iyi 30-37 °C'de ürerler, 42 °C'de de üreyebilirler, ancak 4 °C'de üreyemezler Bazı izolatlar yeşil renk veren piyosiyanın, siyah renk veren piyomelanin, kahverengi renk oluşturan piyoverdin ve rengi koyu kırmızı olan piyorubin pigmenti üretir. Piyosiyanın ve piyoverdin pigmentlerini üreten *Pseudomonas* türleri Müller Hinton Agar (MHA) da yeşil-mavi koloniler yaparlar. Karbonhidratları fermente etmezler, glikoz ve ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirler ama maltozu etkilemez. Nitratlardan gaz oluşturabilirler, L-arginin dehidrolaz pozitifken L-lizin dekarboksilaz negatiftirler. Katalaz ve Simmon's sitrat pozitiflerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın epitel hücrelerine tutunmasını sağlayan pilusları ve protein yapılı adhezinleri vardır. İki çeşit hemolizin üretmekte olup biri ısıya dayanıklı glikolipit olan Lipid A ve diğeri ise ısıya duyarlı bir protein olan fosfolipaz C sayesinde mikrororganizmanın biyolojik etkisini düzenler. Hücre dışı bir enzim olan exotoksin A ise eUF-2'yi inaktive ederek protein sentezinde inhibisyona sebep olmaktadır (15,26).

Biyokimyasal özelliklerine göre farklı şekerlere karşı olan oksidasyon özellikleri, 42°C de büyüme özellikleri ve flagella formasyonlarına göre izolatların identifikasyonu yapılabilmektedir. Tatlı üzüm benzeri koku yaymaları ve piyosiyanın pigmenti üretmeleri *P. aeruginosa* için özel tanı kriteri olarak kabul görmektedir (27,28).

Sağlıklı insanlarda nadiren hastalık etkeni olan *Pseudomonas* bakterisi sık rastlanan bir insan saprofitidir. Konak immunitesinin bozulduğu; yanık, kanser

kemoterapisi, nötropeni, hipogammaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar, endotrekeal entübasyon, uzun süreli üriner veya damar içi kateter uygulamaları, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır (28). *Pseudomonas* enfeksiyonları kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamalı olarak gelişmektedir. Cilt mukoza yüzeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında, virülans faktörleri yanında konağın immun direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları önemlidir. Enfeksiyon bu durumlar ışığında kolonizasyon aşamasında kalabileceği gibi sistemik enfeksiyonlara da ilerleyebilmektedir (15,28).

Pseudomonas aeruginosa, çeşitli eflüks pompalarının ekspresyonu, dış zar geçirgenliğinde azalma ve β -laktamaz enzimi sayesinde β -laktam antibiyotiklerin bir çoğuna intrinsik olarak dirençlidir. Öte yandan *P. aeruginosa* izolatlarında kromozomal mutasyonların sıklığı ve porin değişikliği AmpC'yi aşırı üreten ya da eflüks pompa işlevi artmış mutantların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Antibiyotik baskısının bu mutantları seleksiyona uğratması, çoğul dirençli bir *P. aeruginosa* izolatının ortaya çıkmasına neden olur. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) (sınıf A/grup 2be enzimler) özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunmakla birlikte, 1980'li yıllardan beri *P. aeruginosa* izolatlarında da bildirilmekte ve artarak yaygınlaşmaktadır. *P. aeruginosa*'da bu tür enzimler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize ettiğinden günümüze kadar birçok enzim bildirilmiştir. Bunlar TEM, SHV ve bunların türevleri (TEM-42, TEM-21, SHV-12, TEM-4, SHV-5, SHV-2A), GES-2, GES-1, PER-1, VEB-1 ve IBC tipi beta-laktamazlardır (29). Ambler grup D'de yer alan ve daha çok *P.aeruginosa*'da bulunan OXA tipi (sınıf D) GSBL'ler yer almaktadır ve bu grupta beş farklı oksasilinaz bildirilmiştir. Beta-laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf bir biçimde inhibe edilirler. OXA-I grubu OXA-10, OXA-7, OXA-5 ve türevleri (OXA-17, OXA-16, OXA-14, OXA-11) ile OXA-13 ve türevlerini (OXA-28, OXA-19); OXA-II grubu OXA-20, OXA-15, OXA-3 ve OXA-2 'yi; OXA-III grubu OXA-31, OXA-30, OXA-4 ve OXA-1'i; OXA-IV grubu OXA-9'u; OXA-V grubu ise LCR-1 enzimini içermektedir (30,31,32,33). CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2. *Pseudomonas aeruginosa*'da CLSI kurallarına göre önerilen antibiyotikler ve sınır değerler

Antibiyotikler	CLSI
İmipenem/Meropenem	4/16
Ciprofloksasin	1/4
Levofloksasin	2/8
Amikacin	16/64
Gentamycin,	4/16
Piperacillin-Tazobactam	16/128
Ceftazidime, Cefepime	8/32
Cefaperazon	8/64
Polymixine B, Colistin	2/4
Trimetoprim-Sulfamethoxazole	2/4
Norfloksasin	4/16

Karbapenemler, bakteriyel dirence karşı geliştirilmiş en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler olarak bilinmekle birlikte, özellikle son dönemlerde *Pseudomonas* izolatlarında karbapenamaz üretimindeki artış, bu antibiyotiklere karşı direnci de beraberinde taşımaktadır. Son yıllarda ÇİD *Pseudomonas* enfeksiyonları özellikle YBÜ'lerde yatan hastalarda artarak önem kazanmaktadır. Tedavi seçeneği olarak kombine terapiler denenmektedir (34).

2.2. Beta-Laktam antibiyotiklerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılması

Antibiyotiklerden mikrorganizmaların sadece üremelerini durduranlar bakteriyostatik; mikrorganizmaların ölümüne sebep olanlar ise bakteriyosidal olarak adlandırılmaktadır. Moleküler formasyonunun antibakteriyel etkisinden sorumlu çekirdek kısmında β -laktam halkası içermekte olan antibiyotiklere β -laktam antibiyotikler veya kısaca β -laktamlar denmektedir. Beta-Laktam antibiyotikler bakterilerin hücre duvar sentezini inhibe ederek etkili olmaktadır. β -laktam halkası bir azot ve üç karbon halkasından teşekkül eden doymuş bir halka yapısı göstermektedir (35).

Beta-laktam antibiyotikler, günümüzde en sık kullanılan antibiyotiklerin başında gelmektedir ve başlıca 5 grupta toplanmaktadırlar: (35).

- Penisilinler
- Beta-laktamaz inhibitörleri
- Sefalosporinler
- Monobaktamlar
- Karbapenemler

Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezinde görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidaz gibi enzimleri inhibe ederek hücre duvarı sentezini durdururlar (36). Her grup; Beta-Laktam antibiyotiğin özelliğini veren halka ve bu halkaya bağlı yan zincirlerinin özelliklerine göre belirlenir (37).

Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarında yer alan peptidoglikan yapının sentezinden sorumlu olan ve Penisilin Bağlayan Protein (PBP) adı verilen sitoplazmik membran yerleşimli hedef proteinlere bağlanarak etkili olurlar (38,39). Bakteri hücre duvarının asıl polimeri olan peptidoglikan tabaka hücre duvarına şeklini vermekte ve bakterileri ozmotik basınçlara karşı korumaktadır. Beta laktamlar D-alanyl-D-alanin transpeptidaz aktivitesinde aktif serin tarafında yer alan hidroksil grubunu açilleyerek inhibisyon oluştururlar (39). Beta-laktam antibiyotik tarafından PBP'leri inhibe olan bakteri peptidoglikan sentezlemeye başlayarak hücre duvarının yapısını bozmaktadır. Böylece bakterinin ozmotik yapısı bozularak ve ölecektir. Beta-laktam antibiyotikler hedeflerine bağlanmak ve etkili olabilmek için Outer Membran Protein (OMP) denilen protein kanallarından geçmektedirler. Bu geçiş esnasında periplazmik aralıkta bulunan beta-laktamazlardan da etkilenmemeleri gerektiği bilinmelidir (40).

Penisilinler

Temel formasyonu bir tiazolidinon halkası, beta laktam halkası ve bir yan zincirden oluşmaktadır. Penisilinler, Beta-laktam antibiyotiklerin önemli bir grubunu oluştururlar. Doğal, semisentetik ve geniş spektrumlu penisilinler olarak üç başlıkta toplanmaktadırlar.

Doğal Penisilinler: Klasik doğal penisilinler, penisilin G ve penisilin V bu grupta yer alır. Penisilin V ise oral yoldan kullanımı olan tek penisilin türü olup Penisilin G ise mide asidinde inaktive olacağından sadece parenteral yolla kullanılmaktadır. Doğal penisilinler, başlıca gram pozitif bakterilere ve ayrıca *Bacillus anthracis*, *Clostridium spp.*, *Neiseria spp.* ve *Spiroketlere* etkilidirler. Gram pozitif bakteriler dış membran içermediklerinden, sitoplazmik aralık üzerinde kalın bir peptidoglikan tabaka uzanmaktadır. Beta-laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadırlar. Gram negatif enterik bakteriler ve stafilokoklar etkilenmemektedir (41).

Semisentetik Penisilinler: *Staphylococ*'ların neredeyse tümünün salgıladığı penisilinaz enzimine dayanıklı tek penisilin grubu olan Penisilinazlara dirençli penisilinler bu grupta yer almaktadırlar. Sadece *Staphylococ* enfeksiyonlarında tercih edilmeleri nedeniyle antistafilokokkal penisilinler olarak da adlandırılmaktadırlar. Ancak metisilin dirençli stafilokoklarda (MRS) etkinlikleri yoktur. Metisilin ve nafsilin gibi penisilinazlara dirençli penisilinler ve dikloksasilin, kloksasilin ve oksasilin gibi izoksazolil grubundaki penisilinler bu grupta bulunmaktadır (41).

Geniş Spektrumlu Penisilinler: Karboksipenisilinler, aminopenisilinler, üreidopenisilinler'den oluşmaktadır.

Aminopenisilinler: Bu grup içerisinde amoksisilin, ampisilin, bakampisilin ve pivampisilin yer almaktadır. Aminopenisilin grubu, penisilin'in etki spektrumuna ilave olarak Gram negatif bakterilere de etki ederler. Beta laktamaz oluşturan tüm bakterilere ve *Pseudomonas*'lara etkisiz olup *Enterococ*'lara penisilinlerden daha etkilidirler (41).

Karboksipenisilinler: Bu grup Karbenisilin ve tikarsilin gibi antibiyotikleri içermektedir. Aminopenisilinlerin etki spektrumuna ilave olarak *P. aeruginosa*, *Serratia* ve *Enterobacter* türlerine de etkilidir. *Staphylococ*'lar, *Enterobacteriaceae* familyası ve *Pseudomonas aeruginosa* beta laktamlara karşı oldukça dirençlidirler. *Enterococcus* türlerine etkisiz olmalarına rağmen aminoglikozidlerle kombinasyonları sinerjistik etki oluşturmaktadır. Enterobakterilerden *Klebsiella* türlerine karşı etkili değildirler (41, 42).

Üreidopenisilinler: Azlosilin, piperasilin ve mezlosilin gibi antibiyotiklerin dahil olduğu üreidopenisilinler mikroorganizmalar üzerine oldukça etkilidir.

Antipseudomonal etki güçlerine göre: Piperasilin, Azlosilin >Mezlosilin >Tikarsilin >Karbenisilin olarak sıralanmaktadır (41,43).

Beta-laktamaz (BL) İnhibitörleri

Beta laktam halka özellikleri sebebi ile beta laktam antibiyotiklere oldukça benzeyen BL inhibitörlerinin, tek başlarına antimikrobiyal etkinlikleri oldukça düşüktür. Bunlar klavulonik asit, sulbaktam, tazobaktam ve avibactamdır (41).

Sefalosporinler

Sefalosporinler, 1945 yılında bir fungus olan *Cephalosporium acremonium* fermentasyonu ile elde edilmiştir. Bir beta laktam halkası ile dihidrotiazin halkasının birleşmesinden oluşan 7-amino sefalosporanik asit (7-APA) çekirdek içerirler (41,44). Etki spektrumlarına göre 4 kuşağa ayrılırlar:

Birinci Kuşak Sefalosporinler: Sefadroksil, sefazolin, sefaloridin, sefalotin, sefaleksil, sefapirin ve sefradin bu grupta yer almaktadırlar. Parenteral uygulama yolu ile tüm grubun etkinlikleri birbirine benzemekle birlikte sefazolinin antistafilokokkal etkisi oldukça yüksektir. Bu grup Metisiline duyarlı stafilokoklara ve pnömokoklara etkili bulunmuştur (35).

İkinci Kuşak Sefalosporinler: Sefaklor, sefonisid, seforonid, sefamandol, sefprozil, sefuroksim, sefmetazol, sefotetan, sefoksitin ve sefaklorun analogu olan lorakarbef bu grupta yer almaktadır. Birinci kuşak sefalosporinlere göre stafilokok ve streptokoklara daha az, anaeroblara ve gram negatiflere daha fazla etkilidir. Gram negatif bakteriler karşı etkideki genişlemeye bağlı indol pozitif *Proteus* izolatlarına, bazı *Enterobacter* türlerine ve *H. influenza*'ya oldukça etkilidirler. Anaeroblara karşı etkisi de diğer kuşaklardan daha yüksektir (35).

Üçüncü Kuşak Sefalosporinler: Bu kuşakta sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefiksim, sefpodoksim, seftizoksım, seftibuten, sefdinir ve sefditoren yer almaktadır. Birinci kuşak sefalosporinlere göre gram pozitif koklara

daha az, ikinci kuşaklara göre ise *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* türlerinde daha fazla etkilidirler. *Enterobacter* ve *Serratia* türlerine karşı etkinlikleri sınırlı olduğundan bu bakterilerin enfeksiyonlarında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Gram negatifler ile oluşan ciddi enfeksiyonlarda aminoglikozit kombinasyonları daha etkili olmaktadır (41,44).

Dördüncü Kuşak Sefalosporinler: Bu kuşağa sefepim ve sefpirom dahildir. Gram pozitif bakterilere karşı birinci kuşak kadar etkili bulunurken, Gram negatiflere karşı üçüncü kuşak kadar etkilidirler. Üçüncü kuşak etkilerine ilave olarak *Enterobacter* türlerine karşı da etkili olmaktadır. Anti-anaerob etkiler zayıf olup ciddi gram negatif enfeksiyonlarda ve febril nötropenik hastaların başlangıç terapisinde tercih edilirler. Sefoksitin aminoglikozitler ile kombine terapilerde sinerjistik etki gösterirken diğer sefalosporinlerle kombine terapi tercih edilmez. Çünkü beta-laktamaz üretimini indüklemeye olasıları vardır (41,44).

Monobaktamlar

Aztreonam bu grubun en önemli antibiyotığıdır. Yapısındaki beta laktam halkasına ilave olarak başka halka içermemeleri ile diğer beta-laktamlardan ayrılır. Gram negatifler bakterilerde PBP₃'e bağlanarak hücre duvarı sentezinde inhibisyon gerçekleştirmektedirler. Gram negatiflerden *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* gibi türlere karşı oldukça etkili, gram pozitif ve anaerobik bakterilere karşı etkisizdirler.

Dar etki spektrumundan dolayı polimikrobiyal hastalıklarda tek başlarına kullanılmamalıdır. Üriner sistem enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozitlere alternatif olarak düşünülebilirler (45).

Karbapenemler

Sefalosporinlerin bir çift bağ içeren beş üyeli D halka yapısındaki bir metilen aminoasiti yerine bir sülfürün gelmesi ile diğer beta-laktamlardan ayrılmaktadır. *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen bir bileşik olan tianamisin türevidir olan

Karbapenemler Beta-laktamların en geniş spektrumlu grubudurlar. Mikobakteriler ve *Aeromonas* dışında tüm bakteriyel ajanlara etkilidirler.

GSBL ve AmpC üreten bakterilere karşı oldukça etkili ajanlardır. İmipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem klinik kullanımı oldukça fazla olan antibiyotiklerdir. Biapenem, faropenem ve panipenem ise özellikle Japonya'da kullanılmaktadır (41,46,47).

2.3. Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları

Beta-Laktam Antibiyotiklere karşı oluşan antibiyotik direnci, bir bakterinin antimikrobiyel maddeye karşı korunabilme özelliğine bağlıdır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç çeşitli nedenlere bağlı olabilmektedir.

2.3.1. Doğal Direnç

Bir bakteri türünün genetik yapısından kaynaklanan direnci tanımlamaktadır. Doğal direnç, mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapı taşlarına sahip olmamaları veya ilacın yapısal özelliğinden kaynaklanan hedefine ulaşmasındaki bir soruna bağlı olabilmektedir (48).

2.3.2. Çevreye Bağlı Direnç

Antimikrobiyal maddenin *invivo* ve *invitro* etkinliği arasındaki farkı bağlı olarak gelişen bir tanım olup, *invitro* etkili bulunan bir antimikrobiyel canlı dokuların oksijen basıncı, pH'ı ve doğal bariyerlerine bağlı olarak etki göstermeyebilir (48).

2.3.3. Kazanılmış Direnç

Bakterilerin genetik yapı değişimlerine bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu antimikrobiyal maddeye direnç göstermesi anlamına gelmektedir (35,36). Üç değişik mekanizma ile oluşmaktadır (48).

Kromozoma Bağlı Direnç

Bu direnç tipi kromozomlarda oľıřan spontan bir mutasyona bağlı gerçekteşmektedir. Her gende gerçekteşen spontan mutasyonlar; bakteri hücresinin metabolizma ara ürünleri ve bazı çevre faktörlerine bağlı olarak 10^{-9} ile 10^{-10} sıklıkta oľuřabilmektedir. Bunun sonucu olarak da mikroorganizma hücre yapısında değişikliklere neden olmaktadır.

Bakterilerin ilaç geçirgenliklerinde azalma ya da hedef aldığı yapıda değişiklikler gerçekteşebilir. Ortamda antibiyotik bulunduğunda, duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve dirençli olan bakteriler lehine pozitif seleksiyon gerçekteşecektir (48,49).

Plazmidlere Bağlı Direnç

Plazmidler kromozomdan bağımsız olarak replikasyona uğrayan, kromozom dışı genetik yapılarıdır. Klinikte gözlenen direnç sıklıkla plazmid kökenli olup R plazmid adı verilen yapılar ile antibiyotiklere karşı direnç gelişebilmektedir. R plazmid içeren mikroorganizmalar bu özelliklerini duyarlı bakterilere aktarmakta ve onların da dirençli özellik kazanmasına sebep olmaktadır.

Bu direnç, daha sıklıkla antibiyotiklerin eliminasyonuna sebep olan veya hücre geçirgenliğinin azalmasına sebep olan enzimler aracılığıyla gerçekteşmektedir. En sık rastlanan enzimler TEM-1 ve SHV-1'dir (49,50,51,52).

Transpozonlara Bağlı Direnç

Bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizilerine Transpozonlar denir. Bu yapıların plazmidlerden farkı bağımsız replikasyon göstermemeleridir. Bu yüzden kromozom veya plazmid yapısına dahil olabilmekte ve bunların arasında yer değiştirebilmektedirler (48).

2.4. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimi mikroorganizmalarda üç yolla gerçekleşmektedir.

2.4.1. İlacın Hedef Bölgesindeki Değişiklikler

Beta-laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi olan PBP'lerdeki değişiklikler; PBP sayısında azalma, kromozomal mutasyonlar aracılığıyla PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe ilgisinde azalma veya beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük ilgi gösteren PBP'lerin sentezlenmesi şeklinde gerçekleşebilmektedir (49,50,53).

2.4.2. Dış Membran Geçirgenliğinin Bozulması

Gram negatiflerde beta-laktam antibiyotikler, dış membran proteini denen porlar aracılığı ile hücre içine girebilmektedirler. Geçişler dış membran üzerindeki Porin C ve Porin F ile gerçekleşmektedir. Dış membran üzerinde yer alan ve D₂ proteini olarak adlandırılan protein aracılığı ile imipenem, dış membrandan girmektedir. Dolayısı ile Gram negatif bakterilerde porin F veya C proteinlerini mutasyona uğratan bu durum tüm beta-laktam antibiyotiklere direnci ortaya çıkarırken imipeneme karşı duyarlı kalmaktadır. Nonfermenter bakteriler, dış membran üzerindeki D₂ proteinlerin kaybı ile imipeneme direnç gösterebilmektedirler (49,54).

2.4.3. Beta-Laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi

Penisilinler ve sefalosporinler gibi beta-laktam antibiyotikleri Beta-laktamaz enzimleri, hidrolize uğratarak etkisizleştirerek direnç gelişimine yol açmaktadırlar. Bu enzimler sayesinde beta-laktam halkanın karbonil grubu ile ester köprüsü kurularak siklik amid bağı parçalanmakta ve bir açıl-enzim türevi oluşmaktadır. Daha sonra ise enzim açıl molekül yapısından ayrılmakta ve rejenerasyona başlamaktadır. BL enzimi bakterilerde yapısal olarak bulunabildiği gibi indüklenebilir özellik te

gösterebilmektedir. Gram pozitif bakterilerde çoğunlukla indüklenebilir özellikte iken Gram negatiflerde ise bir kısmı indüklenebilir özellikte bir kısmı da yapısal özelliktedir (49,52).

Bakteri plazmidi, kromozomu, transpozon veya integron gibi taşınabilir genetik elemanlar üzerinde Beta-laktamaz genleri yerleşebilmektedir. Yapısal olarak PBP'lere benzemekle birlikte, hem Gram negatif hemde Gram pozitif aerob ve anaerob bakterilerce sentezlenebilir özelliği göstermektedir. Gram pozitiflerden en çok *Staphylococcus* familyası tarafından sentezlenirler. Anaeroblardan ise *Clostridium* ve *Fusobacterium* lar penisilinleri parçalayabilmekte iken *Bacterioides*'ler ise sefalosporinleri parçalayabilmektedirler. Gram negatiflerde beta laktamazlar periplazmik aralıkta yerleşim göstermekte, Gram pozitiflerde ise direkt hücre dışına salınmaktadır. Bu sebepten dolayı Gram negatiflerde beta laktam direnci ile ilgili olarak antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar önem arz etmektedir (49,54,55,56).

2.5. Beta-laktamazlar

Abraham ve Chain, 1940 yılında penisilinazı bulmuşlar ve günümüze kadar bir çok BL enzimi tanımlanmıştır. Ambler, 1980 senesinde moleküler yapılarına göre beta-laktamazları 4 sınıfa ayırmıştır:

Sınıf A: Serin amino asitini aktif bölgelerinde taşıyan ve özellikle de penisilinleri hidrolizasyona uğratan beta laktamazlardır. Çoğunlukla Gram negatiflerde karşımıza çıkan Temoniera (TEM-1) enzimi bu grubun örneğidir.

Sınıf B: Çinkoya bağlı tiyol grupları ile aktif olabilen metalloenzimler bu grubun elemanıdır.

Sınıf C: Serin aminoasitini aktif bölgelerinde taşıyan, özellikle sefalosporinlere etkili olabilen ve kromozomal Amp C geni ile kodlanan enzimler bu gruptadır.

Sınıf D: Oksasilini hidrolize edebilme özelliğindeki serin beta laktamazlar bu grubu oluşturmaktadır (57).

Beta laktamazların en güncel sınıflandırmasını ise Bush, Jacoby ve Mederios 1995 yılında yapmışlardır. Biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre gruplandırma ile dörde ayrılmış olan bakteriler Tablo 2'de görülmektedir.

- I. Grup:** Klavulonik asit tarafından inhibe edilmeyen sefalosporinazlar,
II. Grup: Sınıf A ve D içinde yer alan Beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimler,
III. Grup: EDTA dışındaki BL inhibitörlerine direnç gösteren MBL'ler,
IV. Grup: Klavulonik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bu grupta yer almaktadır (52).

Birden çok beta laktamaz bir bakteride aynı anda görülebilir ve bu sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Böylece kromozomal kökenli BL enzimleri iç içe geçerler. Kromozomal beta laktamazlar Grup1'de, GSBL enzimleri Grup 2'de ve diğer beta laktamazlar Grup 3'de sorun olarak en sık karşımıza çıkan enzimlerdir.

Tablo 3. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri

Beta Laktamaz Grubu	Alt Grup	Moleküler Sınıf (Ambler)	Substrat	Özellik
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir) Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2 (Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur)	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterekoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM, SHV-1)
	2be	A	Penisilinler, Dar ve Geniş Spektrumlu Sefalosporinler	Oksiimmunosefalosporin ve monobetalaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL)
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) betalaktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden Enzimler
	2d	D	Penisilin, Oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, Karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgedeserin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a,3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktamaz	Metallo-Beta-Laktamazlar
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

2.5.1. Grup 1 (Amp C) Beta-Laktamazlar

Büyük çoğunluğunu kromozomal enzimlerin oluşturmasına rağmen kromozomal plazmidlere AmpC beta laktamaz genlerinin transferi ile meydana gelen plazmid kontrolündeki beta laktamazlar bu grupta yer almaktadır. Moleküler sınıflandırmaya göre Sınıf C'de yer almaktadırlar. Bu grubun enzimleri, penisilinleri, 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize edebilmektedirler. Bu enzimlerin aşırı üretimi ve OMP değişimleri gibi mekanizmalar birleşirse karbapenem direncine yol açabilir. Bu enzimlerin aktif bölgelerindeki yapısal özelliklere bağlı olarak klavulonik asit ve sülfonlar, beta-laktam halkalarına bağlanamazlar. Bu sebepten ötürü beta-laktamaz inhibitörlerinden olan klavulonik asit ve sulbaktama direnç gösterirler (58,59).

Bu grupta yer alan beta laktamaz enzimleri indüklenebilir özellikte olup bakteriler tarafından normalde baskılanıp düşük düzeyde sentezlenmekte iken ortama bir beta laktam antibiyotik ilavesinde enzim sentezinde artış şeklinde ortaya çıkarmaktadır. Farklı beta-laktam antibiyotikler farklı oranlarda artış yaparken, antibiyotik ortamdan uzaklaştığında bakteri tekrar düşük miktarlarda senteze başlar. Böylece kalıcı direnç söz konusu olmamaktadır. Temel sorun ise dereprese mutantların indüksiyona ihtiyaç duymadan yüksek oranda beta laktamaz üretebilmeleridir. İndüklenebilir kromozomal B₁ taşıyan Gram negatif izolatlarda normalde 10⁵-10⁷ arasında bir sıklıkta dereprese mutant bulunabilmektedir. Bu mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi sürekli ve yüksek düzeyde olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde beta-laktamazların kullanımı ile dirençli doğal mutantların ortamda çoğalması sağlanacaktır. Karbapenemler hem indükleyici kromozomal mutantlara hem de dereprese mutantlara karşı etkilidirler. Böylece dereprese mutantların seleksiyonuna sebep olmazlar (49).

1989 yıllarında kromozom kontrolündeki AmpC enzimleri, plazmid kontrolünde görülmeye başlanmıştır. Kromozomal AmpC B₁ genlerinin plazmidlere aktarımları ile plazmid kökenli aktarılabilir AmpC tipi beta laktamazları ortaya çıkarmışlardır. Plazmid kökenli AmpC tipi enzimler indüklenebilir olmama özellikleri ile diğer kökenlerden ayrılmaktadırlar. Günümüzde plazmid kökenli AmpC tipi enzimlerin sayısı yirmiden fazladır. FOX, LAT, MOX, BİL, MIR, CMY örnek olarak gösterilebilir (49,58,59).

2.5.2. Grup 2 Beta-Laktamazlar

Bu grubun tümü moleküler sınıf A ve D'yi içermektedir. Plazmidler tarafından transferleri klinik açıdan önem arz etmektedir. Substrat profil farklılıklarına göre gruplandırılmaktadırlar. Penisilinleri hidrolize uğratan klavulonik asitle inhibe olabilen enzimler bu grupta yer almaktadır (60).

Grup 2a: Gram pozitif bakterilerde yer alan penisilinazlar bu grup içerisine dahil edilmektedir. penisilinleri sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize edebilen enzimler bu grupta bulunmaktadır (49,52,61).

Grup 2b: Bu grupta geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2 ve Sulfhydryl-Variable (SHV-1) enzimleri bulunmaktadır (62).

Grup 2be: Oksiimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize eden yeni BL'ler bu grupta yer almaktadır. Özellikle GSBL'lerin tedavisinde oksiiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bunun sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi enzimlerin 1-4 amino asit formasyonlarında gözlenen değişiklikler nedeniyle GSBL'ler ortaya çıkmıştır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır. GSBL'ler, klavulonik asit, tazobaktam gibi BL inhibitörlerine ve sefoksitin, sefotetan gibi sefalosporinlere duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* izolatlarında yaygın olarak görülürler. Bu grupta yaygın olarak rastlanan *Pseudomonas extended resistance* (PER-1) enzimi ilk olarak ülkemizde izole edilmiştir (62).

Grup 2br: SHV ve TEM enzimlerinin BL inhibitörlerine dirençli mutantları bulunmaktadır. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM türevidir olduğundan inhibitörlere rezistan TEM (IRT) olarak adlandırılır. TRC-1 enzimi ve TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri bu grupta bulunmaktadır (52).

Grup 2c: Bu grup içinde klavulonik asit gibi BL inhibitörlerine duyarlı ve karbenisilini hidrolize uğratan enzimler yer almaktadır. PSE-4, PSE-3, PSE-1, BRO-2, BRO-1, AER-1 ve SAR-1 enzimler bu gruba dahil edilmektedir (52).

Grup 2d: Oksasilini hızlı hidrolize eden beta laktamazlardan OXA grubu enzimler bu grupta yer almaktadır. OXA beta laktamazlar, dar spektrumlu, geniş spektrumlu ve karbapenemaz üreten OXA'lar olmak üzere üç sınıfta toplanmıştır. OXA tipi enzimler GSBL gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize uğratabilirken

karbapenemleri de hidrolize uğratabilmektedirler. OXA-1'den OXA -10'a kadar alt tipleri olan enzimler dar spektrumlu enzimler olup son yıllarda uğradıkları mutasyonlar sayesinde bazıları geniş spektrumlu hale dönüşmüştür (60).

İlk olarak Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde izole edilen OXA-11, *Pseudomonas* izolatında tespit edilmiştir (51). Yine OXA-21, OXA-20, OXA-19, OXA-18, OXA-17, OXA-16, OXA-15 ve OXA-14 dünyada ilk olarak farklı *Pseudomonas* izolatlarında tespit edilmiştir (63,64,65,66,67). İstanbul Üniversitesi Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde ise üç hastanın hayatını kaybettiği OXA-48 üreten karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* salgını bildirilmiştir (68). *Acinetobacter* türlerinde beta laktamaz direncinin temel sebebi OXA tipi beta-laktamazlardır. Özellikle OXA-58, OXA-51 ve OXA-23 en sık rastlanan tiplerdir. İlk olarak 1985 yılında İsveç'te *Acinetobacter baumannii*'de OXA-23 karbapenemaz tespit edilmiştir (69).

Aktif bölgelerinde korunmuş üç bölge içeren D grubu beta-laktamazlar yer almaktadır. Bu bölgeler enzim reaksiyonlarında substrat enzim etkileşimlerini kararlı hale getiren hidrojen bağlarının ve diğer kovalent olmayan bağların meydana gelmesinde görev almaktadır (70). Tablo 3'de grupların içerdiği korunmuş bölgeler açıkça görülmektedir.

Tablo 4. Ambler sınıflamasına göre grup A,C ve D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması (70).

GRUP ADI	1. bölge	2. bölge	3.bölge
GRUP A	Ser ⁷⁰ -X-X-Lys ⁷³ (S-X-X-K)	Ser ¹³⁰ -Asp ¹³¹ - Asn ¹³² (S-D-N)	Lys/Arg ²³⁴ -Thr/Ser ²³⁵ -Gly ²³⁶ (K-T-G, K-S-G, R-S-G, R-T-G)
GRUP C	Ser ⁶⁴ -X-X-Lys (S-X-X-K)	Tyr-Ala/Ser-Asn (Y-A-N)	Lys/Arg/HisThy/Ser-Gly (KT-G)
GRUP D	Ser ⁷⁰ -X-X-Lys (S-T-F-K)	Ser ¹¹⁸ -X-Val/Ile (S-XV)	Tyr/Phe ¹⁴⁴ -GlyAsn (Y-G-N yada FGN)

Grup 2e: Grup 1 deki enzimlerden değişik olarak klavulonik asitle inhibe olan sefalosporinazları kapsamaktadır. *Bacteriodes fragilis* ve *Proteus vulgaris*'in kromozomal enzimleri ve *S. maltophilia*'nın kromozomal L₂ enzimi bu grupta yer

almaktadır. *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal Cb_{1A} ve Cf_{xA}, *E. coli*'den izole edilen EC₋₁ enzimi ile *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Cbla₁ enzimleri bu gruba dahil edilmiştir (52).

Grup 2f: Serin beta laktamazlar grubuna dahil olan karbapenemlere etkili ama metalloenzim olmayan enzimler bu grupta yer almaktadır. 1984 yılında tespit edilen *E. cloaca*'nın indüklenebilen IMI-1 enzimi, 1990 yılında yine bir *E. cloaca* izolatında tespit edilen NMC-A enzimi ve *S. marcescens*'in SME-1 enzimi bu grupta bulunmaktadır. Klavulonik asitle inhibe olabilmektedir ve Aztreonama dirençten sorumlu olup, üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize edememektedirler (52).

2.5.3. Grup 3 Beta-Laktamazlar

Moleküler sınıf B'de yer alan MBL enzimleri bu grubu oluştururlar. Serin yerine aktif bölgelerinde bir Zn⁺² iyonu bulunduran enzimlerdir yani aktiviteleri için Zn⁺² iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Tazobaktam, klavulonik asit ve sulbaktam gibi BL inhibitörleride bu enzimlere etkide bulunmazlar, ama Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi bir metal şelatörleri ile inhibe olabilirler. Bu grupta bulunan enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. Monobaktamlar dışında karbapenemler de dahil olmak üzere tüm beta laktamları hidrolize uğratabilmektedirler. Bu beta laktamazlar a,b,c olmak üzere üç alt grupta toplanırlar (60):

Grup 3a: Bu enzimler karbapenemler ve sefalosporinlere göre penisilinleri daha etkili olarak hidrolize uğrattırlar. Maksimum etki için ortamda Zn⁺² iyonlarına ihtiyaç duyarlar. *S. maltophilia*'nın L₁ enzimleri ve *P. aeruginosa*'da izole edilen VIM-1, VIM-2, VIM-3 CcrA, IMP-8, IMP-7, IMP-6, IMP-5, IMP-4, IMP-3, IMP-2, IMP-1, PCM-1, enzimleri bu grupta yer almaktadırlar (60).

Grup3b: Bu grup enzimler penisilin ve sefalosporinlere karşı hidrolitik etki göstermezler. Bu sebeple varlıklarını nitrosefin testi ile gösteremeyiz. Özellikle de substrat olarak karbapenemleri tercih ederler. *Aeromonas* cinsinden türedikleri için genellikle *A. hidrophilia*'da bulunur ve gerçek karbapenemaz olarak da adlandırılmaktadırlar (60).

Grup 3c: Diğer beta-laktam antibiyotiklere göre karbapenemlere daha zayıf etki gösteren bu grup güçlü sefalosporinaz etkiye sahiptirler. Bu enzim grubu

sefamisinler ve geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere sefalosporinleri çok yüksek seviyede hidrolize uğratabilmektedir. *L. gormanni*'nin MBL enzimi bu grupta yer almaktadır (60).

2.5.3.1. Metallobetalaktamazlar (MBL)

1980 yılında Ambler tarafından MBL'ler sınıf B serin beta laktamazlar içine dahil edilmişlerdir. 1989 yılında ise Bush tarafından grup 3 alınmışlardır. Bu sınıflandırma 1995 yılında güncellenmiş, 1997 yılında ise modifiye edilmiştir (52,71).

MBL'lerin hepsinde bulunan ortak özellik, $\alpha\beta\beta$ katlantısının bulunması ve süper impanse aktif bölge yapılarının olmasıdır. Çoğunlukla esnek bir halka yapısına sahip olan bu yapıların; beta-laktam substratlarının hidrolizini ve bağlanmasını başlattığı düşünülmektedir. Birçok beta-laktam antibiyotiğin MBL'lere substrat olabildiği ve bu özellikleri ile de çok geniş spektrumlu aktivitelerinin oluşmasına neden oldukları bilinmektedir. Sefamisinler ve karbapenemlerin de dahil olduğu geniş bir aralıkta beta-laktam bileşiklere direnç oluşturmaktadırlar (72).

Zayıf substrat olarak kabul edilen tazobaktam, klavulonik asit ve sulbaktam gibi serin inhibitörlerden de etkilenmemektedirler. İlginç olarak MBL'ler aztreonamı inhibe edememektedirler. Aztreonam dışındaki tüm beta-laktamları hidrolize uğratan IMP ve VIM serisi MBL enzimleri içerirler. Aztreonamın bu özelliği nedeniyle terapötik MBL inhibitörü olabileceği şeklinde yorumlar yapılmıştır (73).

diğer aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunduran MBL enzimleri EDTA gibi metal şelatörleri ile inaktive olurlar. MBL enzimi ilk olarak 1960 yılında *B. cereus*'ta tanımlanmıştır, 1980'li yılların başında ise *S. maltophilia*'da tespit edilmiştir. Daha sonra imipenemi hidrolize eden MBL enzimi *A. hydrophila*'da ve *B. fragilis* da tanımlanmıştır (74).

Japonya'da 1991 yılında plazmid kökenli MBL enzimi; *S. marcescens* ve *P. aeruginosa* izolatlarında IMP-1 bulunana kadar sadece kromozomal enzimlerin varlığı bilinmekteydi. Aktarılabılır MBL direnci keşfi ile karbapenemlere direnç gelişimi ile ilgili endişeler de artış dikkati çekmiştir. MBL'leri kodlayan genler Klas 1 ve Klas 3 integronlar aracılığıyla taşınıp, sonra transpozonların içine yerleştirilerek yüksek düzeyde aktarılabılır bir genetik materyal elde edilir. Ayrıca integron içindeki

aminoglikozid direncine neden olan başka gen kasetleri de bu antibiyotiklerin alternatif tedavide kullanımlarına engel teşkil etmektedir. Bütün MBL'ler imipenemi hidrolize edebilir ama bu özellikleri genellikle değişkenlik göstermektedir. Diğer beta laktamaz antibiyotikleri de hidrolizasyon yeteneklerine göre alt gruplara (3a,3b,3c) ayrılmaktadırlar (71,75,76,77,78,79).

Moleküler düzeyde sınıflandırma ve standardizasyonu edilmesi oldukça zor görünen MBL'lerden Sınıf B₁ de çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde üç histidin ve bir sistin amino grubu içeren enzimlerden oluşmaktadır. SFH-1'in yer aldığı Sınıf B₂ ise birinci pozisyondaki histidin yerine asparajin yer almaktadır. Sınıf B₃'de tetramer yapıdaki L₁ enzimi bulunmaktadır (80,81). Metallo-beta-laktamazlar kromozomal ve aktarılabılır MBL'ler olarak ikiye ayrılırlar.

Kromozomal Kodlu MBL'ler

İndüklenebilir özellikte olan bu grup MBL enzimler, bu geni taşıyan bakterilerde genellikle beta-laktam antibiyotiklere direnç veya direnç kazanabilme özelliği kazandırmaktadır. Bu bakteriler genellikle fırsatçı patojenler olarak bilinmektedir (82).

Aktarılabılır MBL'ler

Özellikle plazmid aracılı transferler ile hastane enfeksiyonlarının yayılmasına neden olmaktadır.

IMP tipi Metallo Beta Laktamazlar: İlk olarak 1988 yılında Japonya'da izole edilen bir *P. aeruginosa* izolatında, konjugatif bir plazmidle taşınan MBL geni tanımlanmıştır (83). İmipenem ile beraber Beta-laktam antibiyotikleri de hidrolize edebilme yeteneklerinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir (84).

VIM-tip Metallo Beta Laktamazlar: Geniş spektrumlu enzimler olan bu MBL'ler; karbapenemler dahil bir çok beta-laktam antibiyotiğe etkilidirler. Kazanılan MBL'lerin ikinci baskın grubu VIM tipi enzimlerdir. İlk olarak 1997 yılında İtalya'nın Verona kentinde *P. aeruginosa* izolatında VIM-1 tanımlanmıştır. Özellikle uzak doğu ve Akdeniz bölgelerindeki Gram negatif basillerden izole edilmişlerdir. *P. aeruginosa* izolatlarında tespit edilen bla_{VIM} genellikle integron kaynaklı bir MBL genidir. Şu anda dünyada oldukça yaygın olarak görülmekte olan bla_{VIM}, integron ve transpozonlar üzerinde bulunmaktadır. İtalya'da nosokomiyal enfeksiyonların kaynağı olarak *P. putida* izolatlarında da tespit edilmesi çevre kaynaklı izolatların MBL kaynağı yada

MBL vektörü olabilecekleri düşünülmektedir (85). Ayrıca Yunanistan'da *E. coli* ve birkaç *K. pneumoniae* izolatında VIM-1 tespit edilmiştir (86). İlk olarak Güney Fransa'da 1996 yılında nütropenik bir hastanın kan kültüründen üretilen *P. aeruginosa* izolatında VIM-2, tespit edilmiştir. Bu izolatın sefepim, seftazidim ve imipenem gibi birçok beta-laktam antibiyotiğe dirençli, fakat aztreonama duyarlı oldukları bulunmuştur (87).

Yine Tayvan'da 2001 yılında *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve VIM serisinin yeni ortaya çıkan alt tipi olan VIM-3 izole edilmiştir (88). Yunanistan'dan transfer edildiği bildirilen ve İsveç'teki bir hastanede yatan hastadan elde edilen *P. aeruginosa*'da karbapenem dirençli VIM-4 izole edilmiştir (89). İlk olarak ülkemizden Ankara'dan *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-5 de izole edilmiştir (90). Singapur'daki iki *P. putida* izolatında VIM-6 identifiye edilmiştir (91). Yeni bla_{VIM} genlerinden ilki Kolombiya'da *P. aeruginosa*'dan izole edilen bla_{VIM-8} olarak literatürlere girmiştir (92). Ayrıca İngiltere'den; bla_{VIM-9} ve bla_{VIM-10}, Arjantin ve İtalya'dan ise bla_{VIM-11} tespit edilmiştir (93).

SIM-tip Metallo Beta Laktamazlar: Brezilya'da Sao Paulo'da 1997 yılında Antimicrobial Surveillance Program (SENTRY) araştırma programı dahilinde bir *P. aeruginosa* izolatından tanımlanmış ve bla_{SPM-1} olarak adlandırılmıştır (94). İzolat kolistin dışında standart tüm Gram negatiflere etkili antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. Diğer MBL'lerle kıyaslandığında IMP-1 ile benzerlik oranı % 35.5 olarak bulunmuştur (95,96).

GIM-tip Metallo Beta Laktamazlar: MBL'lerin çoğunda olduğu üzere bla_{GIM-}, 45 kb'lık küçük bir plazmidde transfer edilen Klas 1 integronda bulunur. Bu integron üzerinde iki aminoglikozid direnç geni (aaaA₄ ve aadA₁) ve bir beta-laktamaz gen (bla_{OXA-2}) kaseti de bulunmuştur. GIM-1 metallo beta laktamaz ise ilk olarak 2002 yılında Almanya Dusseldorf'da farklı tıp merkezlerindeki farklı hastalardan izole edilen beş *P. aeruginosa* izolatında yeni bir klas B beta laktamaz olarak gösterilmiştir (German İmipenemase). Bu enzimin IMP ve VIM benzeri enzimlerden içerik olarak tamamen farklı olduğu ve sadece polimiksin B'ye duyarlı olduğu belirlenmiştir. PFGE analizinde türler arasında ayırım yapılamadı. GIM-1 enziminin IMP-1 ile % 43.1, IMP-4 ile % 43.1 ve IMP-6 ile % 43.5 oranında benzerlik gösterdikleri bulunmuştur. VIM-7 ile %

31.2, VIM-1, VIM-4 ve VIM-5 ile % 28.8 ve SPM-1 ile ise % 28 oranında benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (97,98).

OXA tip MBL'ler: OXA tipi enzimler oksasilinaz aktivitesi gösterirler ve MBL'leri ilgilendiren moleküler sınıf D'de yer alırlar. *Acinetobacter* izolatlarında OXA-27, OXA-26, OXA-25, OXA-24 ve OXA-23 tipi, *P. aeruginosa*'da OXA-24, OXA-18, OXA-10 ve OXA-2 tipi saptanmıştır. Bunlar karbapenemaz aktivitesi gösterirler (99,100,101,102,103). Genel olarak seftazidim, sefotaksim, oksasilinazlar ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmezler ya da zayıf bir şekilde hidrolize ederler (104). OXA tipi karbapenemazların büyük çoğunluğu imipenem ve özellikle meropenem karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterirler. Yine eflüks pompalarında aktivite artışı veya dış membran proteinlerinde kayıp ile birlikte bulduklarında daha geniş spektrumlu direncin oluşumuna sebep olurlar. Sınıf D beta-laktamaz genleri kazanılmış özellikte olup, genellikle IS elementleri veya Sınıf 1 integron yapıların üzerinde yerleşirler (105).

MBL'lerin Tespiti

Bakterilerde MBL enzim genlerinin tespiti GSBL'lerin erken tespiti kadar önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik ve genotipik testler kullanılmaktadır.

Deneyel MBL Enzim İnhibitörleri: MBL inhibitörü olarak çok farklı bileşikler bulunmaktadır. Bunlar triflorometil alkoller, ketonlar, tiyoester türevleri, tiyoller, trisiklik doğal ürünler, sisteinil peptidler, süksinik asit türevleri, sülfonil hidrozonlar, bifenil tetrazoller, penisilin türevleri, tiyoksi-sefalosporinler, merkaptokarboksilatlar, 1- β -metilkarbapenem ve sefotetan olarak sıralanabilir (106,107,108,109). Bildiğimiz tüm serin beta laktamaz inhibitör ve inaktivatörleri MBL enzimlerinin tümüne karşı etki gösteremezler. Bütün MBL'lerin inaktivatörü olarak dipikolinik asit ve EDTA 10-phenantholine belirtilmiştir. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanılması, MBL enzimi üreten bakteriler ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde tedavide etkili olamamaktadır. Bütün MBL'lerde etkili olabilecek tek bir inhibitörün bulunması, MBL yapılarındaki aktif bölgelerin farklılığından dolayı oldukça zordur. MBL enzim inhibitörleri ile ilgili diğer bir problem de MBL'lerin aktif bölgeleri memeli hücrelerinin fonksiyonları için hayati

önemi olan enzimlerle benzer özellik göstermeleridir. Örneğin 2-oxaaldehitlerin katabolizması için gerekli bir tiyoesteraz olan gliosalaz-2, MBL enzimleri ile benzer protein yapılarına sahip olup çinko bağlanma bölgeleri ile yapısal benzerlik göstermektedir (110,111).

Çalışmalarda bu bileşikler farklı MBL enzimlerine karşı etkileri araştırıldığı için bileşiklerin birbirleriyle karşılaştırılması oldukça zordur. *P. aeruginosa*'da bulunan Imipenemase (IPM-1) enzimine karşı bazı tiyoeester türevleri, 1- β -metilkarbapenem ve penisinat sülfon gibi bileşikler etkili bulunmakla birlikte çalışılan diğer bileşiklerin MBL'ler üzerine etkili olmadıkları tespit edilmiştir (112).

Fenotipik Metodlar ile MBL Tespiti: Ama bu güne kadar rutin tanıda kullanılmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesi, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin MBL direnç geni taşıdığını tespit eden standart bir fenotipik yöntem ve test kriteri ortaya konamamıştır. MBL'ler aktif bölgelerindeki serin yerine çinko iyonu bulunduran enzimler olduklarından metal şelatörü olan EDTA'nın MBL'yi inhibe etme özelliğine dayalı tespit yöntemleri kullanılmaktadır (112,113).

Kombine Disk Testi (KDT): Plak içerisine iki imipenem diski yerleştirilir. Bir tanesine EDTA 10 μ l eklendikten sonra inhibisyon zon çapı farklılıkları değerlendirilir. Tek başına imipenem diski zon çapı ile EDTA solusyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonundan <7 mm küçük ise MBL pozitif olarak kabul edilmektedir (114,4).

Resim 1. Pozitif Kombine Disk Testi

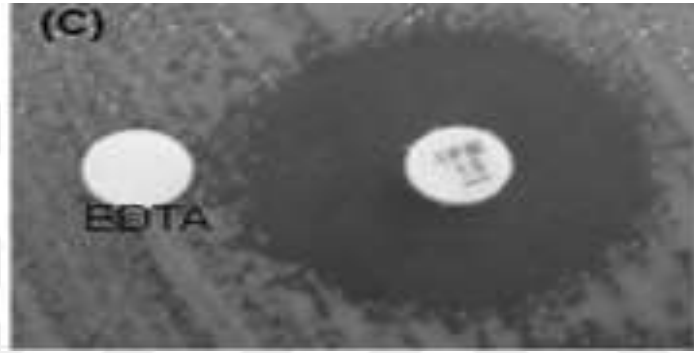


Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST): Bu testte amaç; EDTA varlığı halinde IMP/CAZ inhibisyon zonunun genişleme gösterip göstermemesine bakılarak MBL

pozitifliğinin tanımlanmasıdır. EDTA/MPA (Merkaptoasetik Asit)/SMA (Sodyum Merkaptoasetik Asit) bu amaçla kullanılan kimyasallardır.

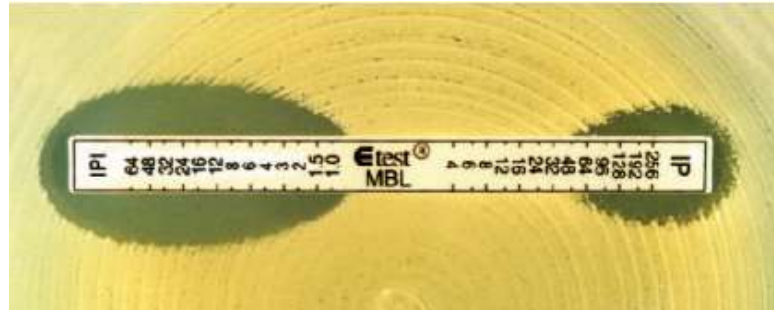
Bu yöntemde IMP veya CAZ diskinin merkezinden 10 mm uzağa boş disk yerleştirilmesi ile yapılmaktadır. Boş disk üzerine EDTA, MPA ve SMA'dan biri eklendikten sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA, MPA ve SMA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir (107, 115).

Resim 2. Pozitif Çift Disk Sinerji Testi



Gradyent Test Yöntemi: Test stribinin bir tarafında imipenem bulunurken diğer tarafta ise imipenem/EDTA bulunmaktadır. İmipenem MİK değerinin EDTA'nın bulunduğu taraftaki MİK değerinden 8 kat altında bir değer bulunması MBL pozitifliği lehine yorumlanmaktadır. Gradyent test MBL belirleme potansiyeli oldukça yüksek olmasına rağmen maliyeti fazla bir yöntemdir (116).

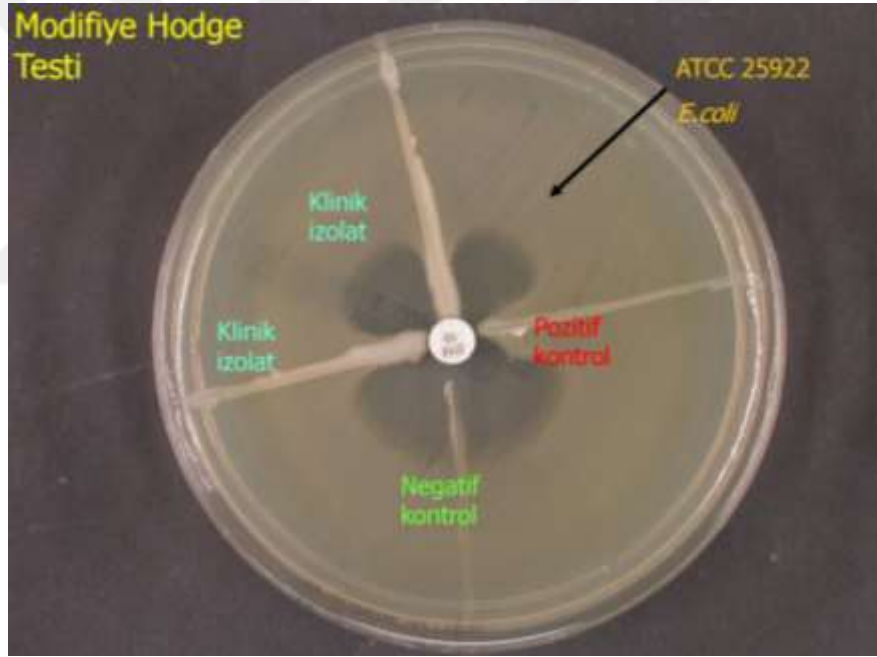
Resim 3. Pozitif Gradyent Testi (117)



Modifiye Hodge Testi (MHT): İmipenem duyarlı bir bakterinin MBL oluşturan bir bakteri ile birlikte olduğunda da üreyebilmesi esasına dayanmaktadır.

Bu test penisilinaz üreten *N. gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge Testinin MBL üretimini gösterebilmek amacı ile *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923 yerine *E. coli* ATCC 25922 kullanılmaktadır. Penisilin diski yerine ise imipenem diski kullanılarak modifiye edilmesi esasına dayanmaktadır. İmipeneme duyarlı bir ATCC *E. coli* izolatının karbapenemaz oluşturan bakteri varlığında imipenemin hidrolizine nedeniyle yonca yaprağı şeklinde inhibisyon zonu içeriye doğru girinti oluşturması şeklinde karbapenemaz varlığının gösterilmesi prensibine dayanmaktadır (115,118).

Resim 4. Pozitif Modifiye Hodge Testi (119)



Diğer Yöntemler: MBL'lerin izoelektrik noktası kromojenik substrat nitrosefinli karşıt boyama jeli yardımı ile tespit edilmektedir. Bu yöntem birbirinden farklı MBL'lerin izoelektrik noktaları hakkında yararlı bilgiler sağlamakla beraber MBL tanımlanmasında önerilmemektedir (120).

Moleküler olmayan testler içinde altın standart olarak belirtilen ve duyarlılığı en yüksek olan yöntem özel spektrofotometrik cihazlar yardımı ile bakteriden

saflaştırılarak elde edilen enzimin imipenem ve meropenem hidrolizininin tespit edilmesidir (121).

Genotipik metodlar ile MBL Tespiti: Genotipik metodların fenotipik metodlara göre duyarlılıkları oldukça yüksektir. Bu metodlar arasında;

- Plazmid analizi
- Ribotipleme
- Pirosekanslama: Tek Lokus sekans analizi, multilokus sekans analizi
- Mikroarray-DNA chip teknolojisi
- DNA Dizi Analizi Esaslı Yöntemler
- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)
- Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler: REP-PCR, AP-PCR
- Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi: RFLP, PFGE

Plazmid Analiz: Bakteriye tiplene yöntemi olarak kullanılan ilk moleküler teknik Plazmid analizi tekniğidir. Plazmidler kendi kendilerine replikasyon yapabilen ve çoğunlukla aktarılabilen prokaryotik sitoplazma içinde ekstrakromozomal DNA elementleri şeklinde bulunan yapılardır. Plazmid izolasyonundan sonra tiplene gerçekleştirilir ve agaroz jel elektroforezi yöntemiyle plazmidlerin sayı ve büyüklükleri kıyaslanır. Bazı bakteriler 100–150 kb büyüklüğünde ayrıştırılması oldukça zor olan büyük plazmidleri taşırlar. Böyle suşlar için, plazmid izolasyonundan sonra uygulanan metodlara bir Restriksiyon Enzimi (RE) ile kesim aşaması ilave edilir. İzolatların ilişki durumlarının yorumlanması meydana gelen çok sayıda fragment nedeniyle daha kolaylaşmaktadır. Plazmid restriksiyonu ayrıca 50 kb'dan daha küçük plazmid formasyonuna sahip *Enterococcus* ve *Staphylococcus*'ların analizi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Lv ve ark. çalışmalarında % 80 oranında ÇİD isolatlar tespit etmiştir. Bu dirençten sorumlu olarak 150 kilobaza (Kb) sahip geniş bir plazmid sorumlu bulunmuştur (121). Chen ve ark. da bu resistans paterninin kromozomal olarak kodlanan genlerden ziyade, plazmidlerle aktarılan genlere bağlı olarak gerçekleştiğini

bulmuşlardır (122). RE analizinin yöneme dâhil edilmesi yöntemin ayırım gücünü artırır (123,124,124,125,126).

Ribotipleme: İzolatların tiplendirilmesinde az-kesen RE (Low-cutting restriction endonuclease) enzimlerine ve PFGE yöntemine ilave olarak RFLP metodu da kullanılmaktadır. Southern blotlama metodunda yorumlanabilecek düzeyde bant sayısı elde edilir. Kromozomal DNA'yı kesen özel restriksiyon enzimleri uygun analizin gerçekleştirilmesi için çok sayıda fragmente ayırarak izolatlar arası genetik kıyaslamaya imkan sağlar. Southern blotlama sayesinde bu sınırlayıcı özelliğin üstesinden gelinebilir. Kısaca, bakteriyel DNA sık-kesen RE (Frequently-cutting restriction enzymes) enzimleri tarafından kullanılarak kesilmektedir. DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle ayrıştırılır ve daha sonra bu fragmentler naylon ya da nitroselüloz bir membrana aktarılır. Sonra radyoaktif ya da kolorimetrik maddelerle işaretlendiği homolog bir DNA parçası (prob) olan özgül DNA dizilimleri membrandaki DNA'ya yapıştırılır. Uygun koşullar sağlanarak, prob denem yapı komplementer bir baz çiftine hibridize edilerek ve proba işaretli bant paternleri uygun koşullarda değerlendirilir. Bu metodun ayırım gücü bakteriyel genomda hedeflenen genetik yapıların kopya sayısı ve elektroforezi işlemini takiben restriksiyon fragmentleri arasındaki dağılımla ilişkili bulunmuştur. Elde edilen fragmentlerin büyüklüğündeki ve sayısındaki değişiklikler mikroorganizmaların tiplemesinde kullanılmaktadır. 2005 yılında yapılan bir çalışmada robotipleme metodu kullanılarak MBL aktivitesi incelendiği *K. pneumoniae* izolatlarının tümünün farklı ribo-gruplarda bulunduğu ortaya konmuştur (131). Fakat 1 *S. marcescens* izolatu ve tüm *P. aeruginosa* izolatları aynı ribogrup 127-415'de bulunmuştur. Southern blotlama metodunun en yaygın hedeflerden biri rRNA geni, ribotipleme metodu kullanılarak analiz edilmektedir. Tipik olarak, ribotipleme metodunun ayırım gücü PFGE ya da diğer PZR-bazlı metotlardan daha zayıf bulunmuştur; ancak bazı organizmalar bu metotla çalışılabilmektedir. Ribotipleme yönteminin potansiyel bir avantajı da oldukça otomatize olması nedeniyle insan gücünden tasarruf sağlaması ve kişiye bağlı farklılıkların sınırlandırılmış olmasıdır (123).

Pirosekanslama: Gerçek zamanlı bir DNA dizi analiz metodu olup, sekans primeri PZR ile amplifiye edilerek tek zincirli DNA kalıbına hibridize edilmektedir. ATP sülfürilaz, DNA polimeraz, lusiferaz, apiraz enzimleri ve bu enzimlerin substratları olan adenzin 5' fosfosülfat ve lusiferin ile inkübasyonları gerçekleştirilir. DNA polimeraz enzimi dNTP'nin DNA zincirine yerleşmesini katalizler. Her nükleotid yerleşimine, yerleşim gösteren nükleotid miktarınca pirofosfat salınımı eşlik etmektedir. Haruta ve ark. 2000 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada pirosekanslama ile DK4 β -lactamaz geni ve onun ürünü olan *K. pneumoniae* DK4'ü orta derece karbapenem direncinden sorumlu bulmuşlardır. Bu resistansın konjugal olarak *E. coli*'lere geçebildiğini belirtmişlerdir (142).

Mikroarray-DNA chip teknolojisi: Hibridizasyon temelli bir test olan bu metod ile tek zincirli nükleik asit sekansları komplementerlerine tutunmaktadır. Dizisi bilinen DNA probu kuyucuklara veya cam yüzeylerde immobilize edilmektedir. Hedef RNA akstraksiyonu ile DNA'ya reverse transkripsiyonu oluşturulur ve floresans boya kullanılarak işaretlenir. Bilinmeyen sekanslardan oluşan hedef DNA lama hibridize olur. Hedef DNA'da bulunan komplementer sekanslar prob DNA'ya bağlanır. Hedef bağlanma sırasında açığa çıkan sinyal floresans şiddeti olarak belirlenir. Bu yöntem ile yapılan yeni araştırmalar, bu metodun *A. baumannii* izolatlarında karbapenemaz varlığını 4 saat gibi kısa sürelerde ortaya konmaktadır. Ayrıca bu metodun duyarlılığı, özgülüğü, negatif prediktif değeri ve pozitif prediktif değeri oldukça yüksek bulunmuştur (143,144).

DNA Dizi Analizi Esaslı Yöntemler: Bu genotipik metod iki başlık altında: Tek lokus dizi tiplendirme (Single locus sequence typing: SLST) ve Multilokus dizi tiplendirme (Multilocus sequence typing: MLST) olarak adlandırılmaktadır. Housekeeping gene olarak adlandırılan 7 korunmuş gen içindeki belirli kısımlar kullanılarak, bakteri izolatlarının tanımlanabildiği güvenilir bir yöntemdir. Her bir genin iç kısmında lokalize olan yaklaşık 450-500 baz çifti büyüklüğündeki parçalar, otomatize DNA dizilimleyicisi sayesinde iki iplikçik yönünde doğru bir şekilde dizilimlenerek kullanılmaktadır. Bakteri türünde lokalize bu farklı dizilimler, her bir korunan temel gene özel farklı alleller olarak atanmakta ve her bir izolat için 7 lokusta bulunan alleller,

allelık profili ya da dizilim analizini belirler. Türlerine ait her bir izolat korunan 7 temel gen lokusundaki allellere karşı gelen 7 tamsayı dizisi aracılığıyla doğru bir şekilde tanımlanmaktadır (138). Bu yöntemle izolatların araştırılması amacıyla önce PZR metodundan faydalanılır. Sonuç olarak elde edilen PZR ürünleri çoklu lokus dizilim analiziyle sayesinde elde edilir (139,140). Young ve ark. 2009 yılında Hindistan *Enterobacteriaceae* izolatlarında gerçekleştirdikleri NDM-1 MBL analizinde MLST metodunu kullanmışlar prevalans ve yaygınlığı belirlemişler. Ülkede antibiyotik kullanımını kontrolünde ve plazmidlerin yayılımında hızlı alarm vermesi sebebiyle bu metodun önemli olduğunu belirtmişlerdir (141).

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi): Alman ve Japon bir grup araştırmacı tarafından 1980'lerin sonunda, proteinlerin peptid kütle parmak izi olarak adlandırılan; kütle spektrometre cihazları için kullanılan bir iyonizasyon tekniğini geliştirmişlerdir. İyonize lazer atışları sayesinde protein, peptid ve şeker gibi biyomoleküllerin ve polimer, dendrimer, makromolekül gibi büyük organik moleküllerin analizi bu metod ile tespit edilmiştir. Frekansı ayarlanmış ve lazer vuruş atımları uygun hale getirilmiş buhar fazında intakt polimer yapıları taşıyan ve polimer zincirlerinin elektrik yüklenmesine sebep olan matriks yapıya enerji aktarırlar (145,146). MALDI-TOF MS ile direnç belirlenmesi; en yaygın olarak duyarlı ve dirençli izolatlar arasındaki spektrum farkının belirlenmesi ile gerçekleştirmektedirler. OXA-24, OXA-23, IMP-7, KPC-3, KPC-2, NDM-1, VIM-1 gibi karbapenemaz üretimine sebep olan genleri saptamak üzere *A. baumannii*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumonia* ve *S. marcescens*'de meropenem ve ertapenemin indikatör antibiyotikler olarak kullanılmaktadır. MALDI-TOF MS metodu ile yapılan yeni çalışmalarda bu yöntemin karbapenemaz saptamadaki duyarlılığının ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu ortaya konmaktadır (6,25,147,148).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yöntemler: Bu yöntemde DNA probing kullanımını sayesinde MBL tespiti yapılmaktadır. Bakterinin MBL geni taşıyıp taşımadığının ve MBL'nin tipinin belirlenmesinde PZR metodu oldukça yaygın olarak

kullanılan bir moleküler yöntemdir. PZR, moleküler biyolojide oldukça fazla tercih edilen bir tekniktir ve basitçe nükleik asitlerin çoğaltılması olarak tanımlanmaktadır. PZR, DNA yapısındaki iki zincirin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (hibridizasyon) ve son olarakta zincirin uzaması (polimerizasyon-çift iplikli DNA'ların sentezi) şeklinde bu siklusların belirli sayıda tekrarı prensibine dayanmaktadır. Her adım uygun olan farklı ısıda gerçekleştirilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna spesifik, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primerin kullanımı sayesinde sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem birkaç saat içinde hedef bölge milyonlarca sayıda çoğaltılabilmektedir (136,137,138). Moleküler metodların altın standardı ise sekans analizi ve klon analizidir (123-135).

Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi: PFGE, RFLP: DNA temelli tiplendirme yöntemleri içerisinde PFGE oldukça önemlidir ve özellikle salgın araştırmalarında yaygın bir kullanıma sahiptir (127). PFGE, moleküler tiplendirme yöntemleri içinde altın standart olarak kabul edilmektedir.

Bu yöntemde; sıvı veya katı besiyerlerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısılı agarozlarda süspanse edilerek küçük kalıplar içine dökülmektedir. Bakteri hücrelerinin deterjan ve enzimler yardımı ile parçalanarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmektedir. PFGE'de bozulmamış DNA yapıları gerekli olduğu için DNA'da kırılmalara sebep olabilen geleneksel DNA izolasyon basamakları bu metod için uygun değildir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıplar birkaç kez yıkanmakta veya diyaliz edilerek karbonhidrat ve protein gibi kontaminantların uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Agaroz içinde bulunan bakteriyel DNA, nispeten az sayıda olan ve büyük parçalar oluşturabilen bir RE aracılığıyla kesime uğratılmaktadır. Daha sonra DNA parçaları bulunduran kalıplar, elektroforez işlemi uygulanacak jel içindeki uygun çukurcuklara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yön değiştirmekte olan elektrik akımı uygulanmaktadır. DNA, elektroforez işlemi sırasında farklı yönlere doğru hareket ettiğinde bantlar birbirinden ayrılmaktadır. Jel üzerine uygulanan elektrik alanının yön değiştirmesi sayesinde daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı hareket edecek ve böylece büyük DNA parçaları geride kalacaktır. 10-800 kilo bazlık DNA segmentlerinin

bu tip bir elektrik akımı ile net olarak ayırımına olanak sağlamaktadır. Elektroforez işlemi sonucunda jel etidyum bromürle boyanmakta ve her bir izolatın içerdiği bant profili görünür hale getirilmektedir. Bilgisayar programları yardımı ile bu bant profilleri değerlendirilmekte ve izolatların birbirleriyle olan ilişkileri belirlenmektedir (128). Bilgisayara dayalı analiz metodlarında, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması için "veri bankası" oluşturulabilmektedir. Böylece çalışılan tüm izolatların profillerinin, daha önce var olan veri bankası verileri ile karşılaştırılma imkanı sağlamaktadır. MBL analizinde ülkemizde ve dünyada oldukça geniş kullanımı mevcuttur (129,130).

2.5.4. Grup 4 Beta-Laktamazlar

Klavulonik asitle inhibe olmayan ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiş olan ve penisilinazlar bu grubu oluştururlar. *A. feacalis*, *B. fragilis*, *Burcholderia cepacia*'daki beta laktamazlar, *C. jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-₂ beta laktamaz bu grubu oluşturmaktadır.

2.6. Karbapenemlere direnç mekanizmaları

Karbapenemler AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olmaları ve membranları hızla aşabilme yetenekleri sayesinde ÇİD Gram negatiflerde tercih edilen antibiyotik grubudur. Karbapenemlere karşı değişik mekanizmalar ile direnç gelişimi gözlenmektedir:

- İlacın bakteri içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması
- Karbapenemleri hidrolize uğratan enzimlerin (karbapenemazların) varlığı (60).

2.6.1. İlacın hücrede etkin konsantrasyona ulaşamaması

Porin Değişimleri

Bu özellikle *P. aeruginosa* izolatlarında görülen temel direnç mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır. *P. aeruginosa*'da karbapenemler için özel bir porin olan

OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında sıklıkla gelişmektedir (71).

Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi

Amfilik bileşikler etkin bir bariyer oluşturan biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir. Amfilik bileşiklerin hücreler üzerine olası zararlı etkilerinden korunabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirilmesinde en önemli olanı aktif pompa sistemleridir.

Aktif pompa sistemleri, bakterileri çoğunluğu amfilik olan ilaçlara ve çeşitli substratların zararlı etkilerine karşı da hücreleri korumaktadır. Bakterilerdeki pompa sistemleri, bazı ilaçların kullanımı ile indüklenebilmekte ve bu direnç tüm substratlara karşı da olabilmektedir (76).

Hastanelerde *P. aeruginosa* izolatları izole edildiğinde beta-laktam antibiyotiklerle tedavisinde MexAB-OprM gibi pompa sistemlerinin aktivasyonu ve bunları kontrol eden regülatör genlerde mutasyonlar oluşabilmektedir. Böylece yalnız beta-laktamlara değil aynı zamanda kloramfenikol, tetrasiklinler, kinolonlar ve trimetoprim de direnç gelişimi gözlenebilmektedir (77,78,79).

2.6.2. Karbapenemazlar: Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimler

Beta-laktam sınıfının en geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip olan karbapenemlerden en az birini belirgin olarak hidrolize eden beta laktamazlar olarak tanımlanmaktadır. Bu enzimlerin büyük çoğunluğu sadece karbapenemlere değil aynı zamanda birçok beta laktam antibiyotiğe de etkilidirler (72,80).

Ekstrinsik Karbapenemazlar: Ambler sınıflandırmasına göre A, B veya D moleküler sınıfa dahil olabilirler. Penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama, tazobaktam, sulbactam, clavulonik asit ve karbapenemlere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. *Enterobacteriaceae* *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* türlerinde tespit edilmiştir. Sınıf A birkaç *Enterobacteriaceae* izolatında tespit edilirken Sınıf D sadece *Acinetobacter spp.*'de bulunmaktadır.

İntrinsik Karbapenemazlar: Moleküler sınıf B'de yer alan bu grup aktif bölgelerinde çinko iyonu içermekte ve BL'ler içinde kendine özgü özelliklere sahiptir. Bu grup karbapenemazlar katalitik aktive için çinko iyonuna ihtiyaç duyarlar ve EDTA ile birleştiklerinde bu özellikleri kaybolmaktadır. Diğer moleküler sınıflara ait enzimler serin bazlı olup kromozomal karbapenemaz aktiviteleri yoktur. Bu grupta *B. cepacia* PCM-1, *S. maltophilia* L₁, *B. fragilis* CcrA, *C. indologenes* IND-1, IND-2, IND-3, IND-4, *B. cereus* II, *C. meningosepticum* bla_B enzimleri bu grupta yer almaktadır. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında 3. Gruba dahil edilmektedir (149).

2.6.3. Hedef PBP Değişimleri

PBP'ler peptidoglikan sentezinde yer alan enzimlerdir. Tek başlarına nadir karşılaşılsada diğer mekanizmalar ile birliktelik gösterdiklerinde önem arzederler. Bu tip direnç gösteren mikroorganizmalar beta laktam antibiyotik varlığında da peptidoglikan sentezini sürdürebilirler (60).

2.7. Hastane Enfeksiyonlarında Moleküler Mikrobiyolojinin Önemi

Hastane enfeksiyonlarına yol açan izolatlar arasındaki ilişkinin belirlenmesi önceleri fenotipe dayalı yöntemlerle gerçekleştirilmekteydi. Fakat fenotipik metodlar zayıf ayırım gücüne sahip olmaları, pahalı ve zaman alıcı olmaları gibi dezavantajları nedeniyle zamanla yerlerini yüksek ayırım gücüne sahip, yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren moleküler yöntemlere bırakmışlardır. Son zamanlarda hastanelerde tanı ve tedavi amacıyla kullanılan steril olmayan aletlerden kaynaklanan (solunum yolu gereçleri, kateterler, endoskoplar) salgınlar karşımıza sıklıkla çıkmaktadır. Sağlık personellerinin elleriyle ve nadiren direkt temas yoluyla da yayılma olmaktadır. Moleküler tiplene yöntemleriyle aynı klinikteki farklı hastaların izolatları veya birçok kliniği ilgilendiren salgın izolatları, hastane çevresi ve sağlık personellerinin ellerinden üretilen izolatların DNA parmak izleri karşılaştırılarak bulaşın kaynağı saptanmaktadır. Moleküler mikrobiyolojik yöntemler sayesinde hastane enfeksiyon etkenlerinin bulaşma yolları, bulaşma mekanizmaları ortaya konulmaktadır. Hastane kaynaklı salgınların önlenmesi için enfeksiyon kaynağının ve yayılma yollarının belirlenmesi için modeller

kullanılarak bir çok analiz gerçekleştirilmiştir (150). Moleküler yöntemler, hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi konusunda yeni açılımlar sağlamıştır. Ayrıca enfeksiyonların izleminde ve hızlı tanısında, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanmasında, antibiyotik direncinin saptanmasında ve yeni teknolojilerin geliştirilmesine sebep olmuştur (150). Salgına sebep olan izolatlar arasındaki ilişkinin saptanması ve kaynağının belirlenmesinde yararlı ve güvenilir bir genotipleme yöntemi olan PFGE “altın standart” olarak kabul edilmektedir (129,130).

Genellikle izolatların duyarlılık durumlarına göre tek başına veya kombine terapilerde fosfomisin, tetrasiklinler ve glisiklinler, rifampin florokinolonlar, aminoglikozidler aztreonam piperasilin- tazobactam ve kolistin kullanılabilir. Tedavi kadar bu izolatların yayılımının önlenmesi de önemli bir basamaktır. Bir hastanede MBL pozitif bir izolatın tespiti terapötik bir problem olmayıp aynı zamanda enfeksiyon kontrol komitesinin de ciddi önlemler almasını gerektiren bir durumdur. Böyle durumlarda laboratuvarlar Enfeksiyon Kontrol Komitelerini acilen bilgilendirmeli ve gerekli uyarılarda bulunularak önlem alınması sağlanmalıdır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Örneklerin toplanması

Çalışma Nisan 2013–Aralık 2014 Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Belirtilen tarihlerde yoğunbakım ünitesinde (YBÜ) takip edilen hastaların imipenem veya meropenem dirençli 51 *Acinetobacter baumannii* ve 51 *P. aeruginosa* olmak üzere toplam 102 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen izolatlar, boncuklu tüpler (Cryoinstant, Deltalab, İspanya) içersine alınarak çalışmaya başlanıncaya kadar -80°C’de buzdolabında (Sanyo, Japon) saklandı. Çalışma için -80 °C’den çıkarılan boncuklu tüpler içerisindeki boncukların brain heart infuzyon agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) besi yerlerine ekimleri yapıldı. 35 °C’de 18-24 saat inkübe edildi. Bu izolatlara iki kez pasaj işlemi uygulandı.

3.2. Klinik örneklerden bakteri idenfikasyonu

Klinik örneğin türüne göre ekim yapılan besiyerinde üreme gösteren izolatlar için identifikasyon işlemi uygulanmıştır. İdentifikasyon işlemi önce standart mikrobiyolojik yöntemlerle yapıldı. Gram boyama ile Gram negatif basil ve koko basil görünümünde olan tüm izolatlar, otomatize sistem Phoneix¹⁰⁰ (Becton Dictinson, USA) ile de bakterilerin tiplendirilmesi işlemi gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen izolatların 51’i *Acinetobacter spp.* ve 51’i *P. aeruginosa* olarak identifiye edildi. MBL tayininde fenotipik analizlerden; kombine disk, çift disk sinerji, Modifiye Hodge testi kullanıldı

3.3. Kullanılan besiyerleri

Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere): Toz besiyerinden 40 g alarak 1000 ml distile su içinde iyice çözülene kadar ısıtıldı. 121°C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra, 50 °C’ye kadar soğutulup, içine % 5 oranında insan kanı ilave edildi. Besiyerleri

kullanılana kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı. izolatların identifikasyonu ve antibiyogramı yapıldı.

Eosin metilen blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere): Toz besiyerinden 37,5 gr alınarak 1000 ml distile su içinde iyice çözülene kadar ısıtıldı. 121°C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 100 ml steril petri kutularına aktarıldı. Katılaşması için oda sıcaklığında tutuldu. Besiyerleri kullanılana kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı. İzolatların identifikasyonu ve antibiyogramı yapıldı.

Mueller hinton agar (Oxoid, İngiltere): Toz besiyerinden 38 gr 1000 ml distile su içinde iyice çözülene kadar ısıtıldı. 121°C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 100 ml steril petri kutularına aktarıldı. Katılaşması için oda sıcaklığında tutuldu. Besiyerleri kullanılana kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı. Karbapenem direnç durumlarının doğrulanması ve MBL analizi için fenotipik testlerde kullanıldı.

3.4. Antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi

Tüm izolatlar için antibiyotik duyarlılık testleri Kirby Bauer Disk difüzyon yöntemi ve otomatize Phonex¹⁰⁰ (Becton Dickison, USE) otomatize sistemi panelleri ve kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları CLSI (152) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Bu klavuza göre disk difüzyon ve MİK testi sınır aralıkları Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. *Acinetobacter baumannii* ve *P aeruginosa* için zon çapı ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) standartları (152).

Antimikrobik İlaç	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)			MİK Değeri (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
İmipenem	10 µg	≤19	16-18	≥15	≥2	4	≤8
Meropenem	10 µg	≤19	16-18	≥15	≥2	4	≤8

Otomatize sistemle antibiyotik duyarlılık testleri: Üretici firmanın uyarıları doğrultusunda, bakterilerin saf kültürlerinden pamuklu swap yardımıyla koloniler

toplanarak ID Broth solüsyon tüpünün içerisine süspanse edilerek, t rbidometre cihazı (BD, PhoenixSpec, Nephelometer, USA) kullanılarak son bulanıklığı 0.5 McFarland standard yoğunluğunda olması sağlandı. 0.5 McFarland standard yoğunluğunda hazırlanan ID Broth solüsyonundan 25  l pipet yardımıyla, önceden hazırlanan AST Broth solüsyon tüpüne aktarıldı. Daha sonra, elde edilen solüsyonlar Gram negatif paneller içerisindeki uygun kuyucuklara inoküle edildi ve Phoenix cihazına dikkatlice yerleştirildi.  nk basyon süresi sonunda identifikasyon ve antibiyogramları tamamlanan örneklerin değerlendirilmesi BD EpiCenter™ yazılımı kullanılarak yapıldı.  mipenem ve meropenem için Minimum  nhibit r Konsantrasyonu (M K) değeri ≥ 2 olarak  l ld . *A. baumannii* ATCC 19606 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kontrol izolatları panelde kullanılmıştır.

Kirby Bauer disk difüzyon testleri: 0.5 McFarland standard yoğunluğunda hazırlanan ID Broth solüsyonu MHA plağa imipenem (10  g) ve meropenem (10  g) Bioanalyse diskleri yerleştirildi. Plaklar 37 C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra diskler etrafındaki zon çapları  l lerek değerlendirildi.  mipenem ve meropenem dirençli 102 izolatın zon çapı ≤ 19 idi (123).

EDTA solüsyonu hazırlama protokolü: Öncelikle EDTA stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için, 1000 mL distile suda 186.1 g disodyum EDTA (Sigma Chemicals, Almanya) 2H₂O  z d r lerek 0.5 M EDTA solüsyonu elde edilmiş ve NaOH ile pH 8.0'e ayarlanmıştır. Otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Ayrıca bu testlerde imipenem (10  g/ml, Bioanalyse-Türkiye), boş disk (Bioanalyse-Türkiye) ve meropenem (10  g/ml, Bioanalyse-Türkiye) diskleri kullanılmıştır.

3.5. Fenotipik yöntemler ile MBL üretiminin doğrulanması

3.5.1. Kombine Disk Testi ile MBL üretiminin doğrulanması

Bakterilerin 0,5 McFarland uygun s spanسیونları hazırlandı ve Mueller Hinton Agar plağına pamuklu swap yardımıyla besiyerinin her yerine sürüldü. Plağın bir yerleştirilen iki imipenem diskinden bir tanesine 10  l EDTA (0.5 M, pH 8) ilave edildikten sonra inhibisyon zon çapı farklılıklarına göre değerlendirme gerçekleştirildi.

EDTA solusyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından >7 mm büyük ise MBL pozitif olarak kabul edildi.

3.5.2. Çift Disk Sinerji Testi ile MBL üretiminin doğrulanması

Bakterilerin 0,5 McFarland uygun süspansiyonları hazırlandı. Mueller Hinton Agar plağına pamuklu swap yardımıyla besiyerinin her yerine sürüldü. Plağın kalan bölümüne İmipenem diski ve bu diskin merkezinden 10 mm uzağa boş disk yerleştirildi. Boş disk üzerine 10 µl EDTA (0.5 M, pH 8) eklendikten sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir.

3.5.3. Modifiye Hodge Testi ile MBL üretiminin doğrulanması

E. coli ATCC 25922 standart izolatının 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Mueller Hinton Agar plağı pamuklu swap yardımıyla besiyerinin her yerine sürüldü. Plağın ortasına imipenem diski konduktan sonra test edilecek mikroorganizma, bu diskin kenarından periferine doğru eküvyon ile çizgi ekimi yapıldı. 35 °C'de 18 saat inkübasyonun sonunda plaklar değerlendirildi. Süre sonunda imipenem diskinin etrafında inhibisyon zonundaki çarpıklık veya yonca yaprağı gibi görünüm pozitif olarak kabul edildi. Bu test için pozitif kontrol olarak Malatya İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarından elde edilen MBL pozitif VIM-1 kullanıldı.

3.6. Genotipik yöntemlerle karbapenemazların saptanması

3.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu yöntemle MBL üretimi açısından önemli genlerden IMP, VIM, GES, GIM, SPM, OXA-51, OXA-23, OXA-10 araştırıldı. PZR yöntemi Ekstraksiyon, Amplifikasyon, Agaroz Jel Elektroforezi basamaklardan oluşmaktadır;

3.6.1.1. DNA izolasyonu (Ekstraksiyon)

İzolatlar genotip tayini için pasajlandı. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 1ml steril distile su içerisinde 4 Mcfarland bulanıklığında süspanse edildi. Her bir örnek en az 5 dakika vorteksenerek homojen hale getirildi. Daha sonra Qiasymphony (Qiagen, Almanya) total nükleik asit izolasyon kiti ile DNA ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen DNA örnekleri -20°C’de PCR işlemine kadar saklandı.

3.6.1.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon için GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/ USA) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon tüpleri cihaza yerleştirilerek 94°C’de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 94°C’de 30 saniye denatürasyon, primer bağlanması için 60°C’de 30 saniye ve 72°C’de 1 dakika uzama ile toplam 35 siklus ve final uzama olarak 72°C’de 10 dakika olacak şekilde uygulandı. PZR için solusyonları Tablo 6’de ve kullanılan primerler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 6. TopTaq (Qiagen) PZR reaksiyon karışımının hazırlanması

Karışım	Miktar
2X TopTaq Master Mix karışımı	12.5 µl
10X CoralLoad Concentrate	2.5 µl
Primer-F	1 µl
Primer-R	1 µl
DNAaz RNAaz free saf su	7 µl
DNA	1 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 7. PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler

Hedeflenen gen bölgesi	Hedef Primer Adı	Primer dizilimi (5'-3')	Referans
<i>blaIMP/188</i> bç	IMP-F IMP-R	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	1
<i>blaVIM/390</i> bç	VIM-F VIM-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	1
<i>blaGES/864</i> bç	GES-F GES-R	ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	2
<i>blaGIM/477</i> bç	GIM-F GIM-R	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	1
<i>blaSPM/271</i> bç	SPM-F SPM-R	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	1
<i>blaOXA-51</i> grup/353 bç	OXA-51-F OXA-51-R	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	3
<i>blaOXA-23</i> grup/501 bç	OXA-23-F OXA-23-R	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	5
<i>blaOXA-10</i> grup/720 bç	OXA-10-F OXA-10-R	GTCTTTCGAGTACGGCATT ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	2

3.6.1.3. PZR reaksiyonunun Agaroz Jel Elektroforezi:

Agaroz jel elektroforez için hazırlanan karışımlar

10xTBE buffer:

Tris-Hydrochlorid (AppliChem, Darmstadt)	121.1 gr
EDTA di-sodiumsalt dihydrate (AppliChem, Darmstadt)	3.8 gr
Boric Asit ((AppliChem, Darmstadt)	55.55 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı, pH: 8,0'e ayarlandı.

1xTBE buffer:

Stok solüsyonu 10xTBE'den 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı

Gel loading dye

Bromphenol	40 mg
Gliserol	5 ml
0.5 M EDTA	1.5 ml
Distile su	4.5 ml olacak şekilde karıştırılır.

% 1.5 Agaroze jel: Agaroze (AppliChem Agaroze low EEO)'dan 2.25 gr, 1xTBE tamponundan 150 ml alınıp karıştırılarak mikrodalga fırında (Arçelik) eritildi. Üzerine 5 mg/ml'lik etidyum bromürden 0.5 mg/ml olacak şekilde bırakılarak 10 dakika soğumaya bırakıldı. Kalıbın içindeki jelin katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletildi. Katılaştıran jel kalıbı taraklar çıkartıldıktan sonra kuyucuklar negatif kutupta olacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Tankın içi jelin üzeri tamamen kapatıncaya kadar 1X TBE ile dolduruldu. Çoğaltılmış DNA örneklerinin her birinden 10 µL ve DNA molekuler ağırlık standardından 5 µL alınarak agaroze jel kuyucuklarına negatif ve pozitif kontrol de olacak şekilde yükleme yapıldı ve 100 voltta 2 saat yürütüldü. Oluşturulan bantlar UV ışığı altında DNA molekuler ağırlık standardı [DNA Molecular Weight Marker IX (0.1-10.0 kb, Roche, Germany)] ile karşılaştırılarak yorumlandı ve fotoğrafları Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) ile çekildi.

3.6.2. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* PFGE protokolü

İzolatlar arasındaki klonal ilişkilerin tespit edilmesi için Durmaz ve ark. uyguladıkları, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (120-121).

3.6.2.1. İzolatların hazırlanması

Biyokimyasal ve/veya otomatize sistemle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden İnsan Koyun Agar (İKA) besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) içinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13 000 x g 4°C'de 2 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agarozla gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

3.6.2.2. İzolatların agaroz gömülmesi

HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlandı. 0.2 g agaroz, 100 ml'lik balona konuldu. Üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2–3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz karışımından 500 µl'lik ependorf tüplere dağıtıldı ve işlem süresince 45-50°C'lik kuru ısı bloğunda bekletildi. HST içinde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500 µl alınarak 50°C ısı bloğunda bekletilen düşük erime ısılı agaroz 1/1 oranında eklendi. Pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. Agaroz karışımı hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (1mm by 5mm by 1.5mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, yaklaşık 10 dakika bekletilerek agarozun homojen olarak katılaşması sağlandı.

3.6.2.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

Beş ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre parçalama tamponu-1 (HPT-1) (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak HPT-1 solüsyonuna yerleştirildi. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. HPT-1 dökülerek, yerine 0.5 ml HPT-2 (0.5 M EDTA, 1 mg/ml proteinaz K) konuldu. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.6.2.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Agaroz kalıplar içerisine gömülen hücrelerin parçalama işleminin ardından HPT-2 aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50 °C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen aspire edilip, su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Su tamamen aspire edildi.

Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) tamponuyla yıkandı. Böylece içerisinde hücre kalıntılardan arındırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.6.2.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistüri yardımı ile 1/3 oranında kesildi. *A. baumannii* için etkinliği daha önce araştırılmış olan *ApaI*, *Pseudomonas aeruginosa* için *Xba-I* enzimi kullanıldı.

***A. baumannii* DNA'sını içeren kalıpların *ApaI* RE ile kesimi:**

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x *ApaI* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklandı). Sonra sıvı aspire edildi.
2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x <i>ApaI</i> tamponu	10 µl
<i>ApaI</i> enzimi (50 U / µl (New England Biolabs))	1 µl
<u>Steril Ultra Saf Su (Reagent Grade Type 1)</u>	<u>89 µl</u>
Toplam Hacim	100 µl

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 25°C'de 2 saat inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi ve elektroforeze uygun hale getirilmiş oldu.

***P. aeruginosa* DNA'sını içeren kalıpların Xba-I RE ile kesimi:**

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x *XbaI* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklandı). Sonra sıvı aspire edildi.

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x <i>XbaI</i> tamponu	10 µl
<i>XbaI</i> enzimi (12 U / µl (Promega Co, USA))	3 µl
BSA (10 mg/ml)	1 µl
<u>steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)</u>	<u>86 µl</u>
Toplam hacim	100 µl

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi ve elektroforeze uygun hale getirilmiş oldu.

3.6.2.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

0.5x TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde % 1' lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. 1 gr "pulsed-field certified agarose" 200 ml'lik balona konup üzerine 100 ml 0,5x TBE eklendi ve mikrodalga fırında agar homojen bir şekilde eritildi. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50°C'lik su banyosuna konuldu. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı ve RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol izolatına ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım

DNA'nın yürüyeceği yöne gelecek şekilde, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Kaset çerçeveleri çıkarılarak 1900-2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.6.2.7. Elektroforez

A. baumannii için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 24 saat (TBE tamponu pH=8.0) olarak uygulandı.

P. aeruginosa için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

Başlangıç vuruş süresi 1 sn, bitiş vuruş süresi 17 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 24 saat (TBE tamponu pH=8.5) olarak uygulandı.

3.6.2.8. Sonucun gözlenmesi ve analizi

a. Elektroforez sonrasında jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf suda 20 dakika bekletildi. UV ışık altında görüntülendi.

b. Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi.

c. Gel Compar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada MBL aktivitesini tespit etmede kullanılan fenotipik testlerin gold standart PZR metodu ile karşılaştırılarak duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır:

Duyarlılık=(Gerçek pozitif izolat sayısı/Gerçek pozitif izolat sayısı+Hatalı negatif izolat sayısı)×100

Özgüllük=(Gerçek negatif izolat sayısı/Gerçek negatif izolat sayısı+ Hatalı pozitif izolat sayısı)×100

PPD=(Gerçek pozitif izolat sayısı/Gerçek pozitif izolat sayısı+Hatalı pozitif izolat sayısı)×100

NPD=(Gerçek negatif izolat sayısı/Gerçek negatif izolat sayısı+ Hatalı negatif izolat sayısı)×100

Moleküler bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Pearson korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA (Unweighthed Pairwise Grouping Matematical Avenaging matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi kullanıldı. İzolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak ayırt edilemez (benzerlik > % 95), benzer (benzerlik > % 90-95) ve farklı (benzerlik < % 90) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle % 95'in üzerinde benzerlik gösteren izolatlar ana klon; ana klonlar içerisinde de % 90'nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları % 90'in altında olan izolatlar ise diğerlerinden farklı olarak değerlendirildi (129,130).

3.8. Çalışma Onayı

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 04.04.2014 tarih B.30.2.YYU.0.01.00.00/29 nolu kararı ile çalışmaya başlanmıştır. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2014-TF-U109 proje olarak desteklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Örnek türleri ve izolatların özellikleri

Çalışmaya karbapenem dirençli 51 *P. aeruginosa* ve 51 *A. baumannii* olmak üzere toplam 102 adet izolat dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan 102 izolatın 18'i (% 18) çocuk yoğun bakım, 84'ü (% 82) yetişkin yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Hastaların yaşı 11 günlük ve 87 yaş arasında değişmekteydi (ortalama yaş: 35.6, SS: 23.6). Her biri farklı hastadan izole edilen bu izolatlar izolasyon tarihlerine göre kronolojik olarak numaralanmıştır. Hastaların YBÜ'de kalış süresi ortalama 3.3 ay olduğu belirlenmiştir. Hastalar ağırlıklı olarak solunum yolu enfeksiyonları nedeniyle (% 53) takip edilmekteydi. Çocuk YBÜ'de 10 adet *P. aeruginosa* ve 8 adet *A. baumannii* izole edilirken, yetişkin YBÜ'de 43 adet *A. baumannii* ve 41 adet *P. aeruginosa* izole edilmiştir. İzolatların elde edildiği yer ve örnek türlerine göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Elde edildikleri birimlere göre izolatların ve örnek türlerinin dağılımı

Klinik	Örnek	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Çocuk Y.B.Ü (n=18)	Kan	7	0
	İdrar	0	5
	Kulak	0	2
	Trekeal Aspirat	1	1
	Yara	0	1
	BOS	0	1
Yetişkin Y.B. (n=84)	Trekeal Aspirat	32	20
	Yara	5	6
	İdrar	1	9
	Kan	3	2
	Kulak	0	3
	Plevra Sıvısı	2	1
	Toplam		51

4.2. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık sonuçları

Çalışmada disk diffüzyon ve otomatize sistemle imipenem ve meropenem dirençli bulunan 51'i *A. baumannii*, 51'i *P. aeruginosa* izolatlarının diğer antibiyotiklere duyarlılık test sonuçları Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 9. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	<i>A. baumannii</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
	n	S	I	R (%)	n	S	I	R (%)
Aztreonam	51	0	0	51 (100)	51	13	8	30 (59)
Gentamisin	51	0	0	51 (100)	51	20	2	29 (57)
Seftazidim	51	0	0	51 (100)	49	20	6	23 (45)
Ciprofloksasin	51	0	0	51 (100)	51	28	3	20 (39)
Sefoperazon	51	0	0	51 (100)	51	17	15	19 (37)
TPZ	51	0	0	51 (100)	51	33	0	18 (35)
Levofloksasin	51	0	0	51 (100)	37	20	1	16 (31)
Sefepim	51	0	0	51 (100)	51	17	21	13 (26)
SAM	51	0	0	51 (100)	-	-	-	-
Seftriakson	51	0	0	51 (100)	-	-	-	-
TIC	51	0	0	51 (100)	-	-	-	-
Amikasin	51	2	0	49 (96)	51	37	4	10 (20)
TMP-SXT	51	20	0	31 (61)	-	-	-	-
Kolistin	51	51	0	0 (0)	5	5	0	0 (0)
Norfloksasin	-	-	-	-	14	10	0	4 (8)

n: test edilen izolat sayısı, TPZ: Piperasilin-Tazobaktam, SAM: Ampisilin-Sulbaktam, TIC: Tikarsilin-Klavulonat, TMP-SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol

Tablo 10. *A. baumannii* için antibiyotik duyarlılık test sonuçları

SIRA NO	KODU	AK	SAM	AZT	GN	CİP	LEV	FEP	SCP	CRO	TPZ	TIC	TMP-SXT	CAZ	CL
1	A1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
2	A2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
3	A3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
4	A4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
5	A5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6	A6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7	A7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
8	A9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
9	A10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
10	A11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
11	A12	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
12	A13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
13	A15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
14	A16	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
15	A17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
16	A19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
17	A20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
18	A21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
19	A22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
20	A24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
21	A25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
22	A26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
23	A27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
24	A29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
25	A31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
26	A32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
27	A33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
28	A34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
29	A35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
30	A36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
31	A37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
32	A38	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
33	A41	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
34	A42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
35	A43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
36	A44	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
37	A45	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
38	A46	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
39	A47	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
40	A48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
41	A49	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
42	A50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
43	A51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
44	A52	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
45	A53	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
46	A54	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
47	A55	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
48	A56	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
49	A57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
50	A58	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
51	A59	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S

Tablo 11. *P. aeruginosa* için antibiyotik duyarlılık test sonuçları

SIRA NO	KODU	AK	AZT	GN	CİP	LEV	FEP	SCP	TPZ	CAZ	NOR	CL
1	P1	S	R	S	S	-	I	I	S	I	R	
2	P2	S	R	S	S	-	S	I	S	S	S	-
3	P3	S	R	S	S	-	S	I	S	-	S	-
4	P4	S	R	S	I	R	R	R	R	R	-	S
5	P5	S	I	R	R	R	R	R	R	R	-	-
6	P6	S	I	I	R	-	I	I	R	R	S	-
7	P7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	S
8	P8	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-
9	P9	I	R	R	R	-	S	S	R	TE	R	-
10	P11	S	R	S	R	R	I	R	R	R	-	-
11	P12	R	R	R	R	R	S	R	S	S	-	-
12	P13	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
13	P14	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
14	P15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	S
15	P17	R	R	I	S	I	R	R	R	R	-	-
16	P18	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
17	P19	R	R	R	R	R	I	I	R	R	-	-
18	P20	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
19	P21	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
20	P22	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
21	P23	I	R	R	R	-	I	R	R	R	R	-
22	P24	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
23	P25	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
24	P26	S	I	S	S	S	I	R	S	R	-	-
25	P27	S	R	S	S	-	I	R	S	R	S	-
26	P28	S	R	R	R	R	I	I	S	S	-	-
27	P29	R	R	R	I	-	R	I	R	R	S	-
28	P30	S	R	S	S	-	I	R	S	R	S	-
29	P31	R	R	R	I	-	I	I	R	R	S	-
30	P32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	S
31	P33	S	R	S	R	R	I	I	S	S	-	-
32	P34	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	S
33	P35	S	R	S	S	S	I	R	S	R	-	-
34	P36	S	I	S	R	-	I	I	S	R	S	-
35	P37	S	I	S	S	-	I	I	S	I	S	-
36	P38	I	I	R	R	-	R	R	R	S	S	-
37	P39	S	R	S	S	S	I	S	S	R	-	-
38	P40	S	I	S	R	R	I	I	S	I	-	-
39	P41	S	I	S	S	R	R	S	S	I	-	-
40	P42	I	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-
41	P43	S	R	S	S	S	R	R	S	I	-	-
42	P44	S	R	S	S	S	I	I	S	R	-	-
43	P45	S	R	S	R	R	I	I	S	R	-	-
44	P46	S	R	S	S	S	I	R	R	R	-	-
45	P47	R	R	R	R	R	I	I	S	S	-	-
46	P48	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
47	P49	S	R	S	S	S	I	S	S	I	-	-
48	P50	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
49	P51	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
50	P52	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-
51	P53	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-

4.3. Fenotipik testlerle MBL üretiminin doğrulanması

4.3.1. Kombine Disk Testi

KDT, 102 izolatının 67'inde pozitif bulunurken 35'inde negatif bulundu. *A. baumannii* izolatlarının 48'inde (% 94) KDT testi pozitif iken, 3'ünde (% 6) negatif bulundu. *P. aeruginosa* izolatlarında ise; 19'unda (% 37) pozitif, 32'sinde (% 63) negatif bulundu (Tablo 12, Resim 5).

Tablo 12. İzolatlara göre KDT sonuçlarının dağılım yüzdesi

İzolat Adı	KDT	n (%)
<i>A. baumannii</i>	+	48 (% 94)
	-	3 (% 6)
<i>P. aeruginosa</i>	+	19 (% 37)
	-	32 (% 63)

Resim 5. Kombine Disk Testi Pozitifliğinin Gösterilmesi.



4.3.2. Çift Disk Sinerji Testi

İmipenem-EDTA ile yapılan çift disk sinerji testi *A. baumannii* izolatlarının tamamı negatif bulunurken, *P. aeruginosa* izolatlarının 27'si (% 53) pozitif olarak bulundu (Tablo 13, Resim 6).

Tablo 13. İzolatlara göre ÇDST sonuçlarının dağılım yüzdesi

İzolat Adı	ÇDST	n (%)
<i>A. baumannii</i>	+	0 (% 0)
	-	51 (% 100)
<i>P. aeruginosa</i>	+	27 (% 53)
	-	24 (% 47)

Resim 6. Çift Disk Sinerji Testi Pozitifliğinin Gösterilmesi.



4.3.3. Modifiye Hodge Testi

MHT, 39'u (% 77) *A. baumannii* ve 10'u (% 20) *P. aeruginosa* olmak üzere 102 izolatının 49'unda pozitif bulundu (Tablo 14, Resim 7).

Tablo 14. İzolatlara göre MHT sonuçlarının dağılım yüzdesi

İzolat Adı	MHT	n (%)
<i>A. baumannii</i>	+	39 (% 77)
	-	13 (% 23)
<i>P. aeruginosa</i>	+	10 (% 20)
	-	41 (% 80)

Resim 7. MHT Pozitifliğinin Gösterilmesi.



4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sonuçları

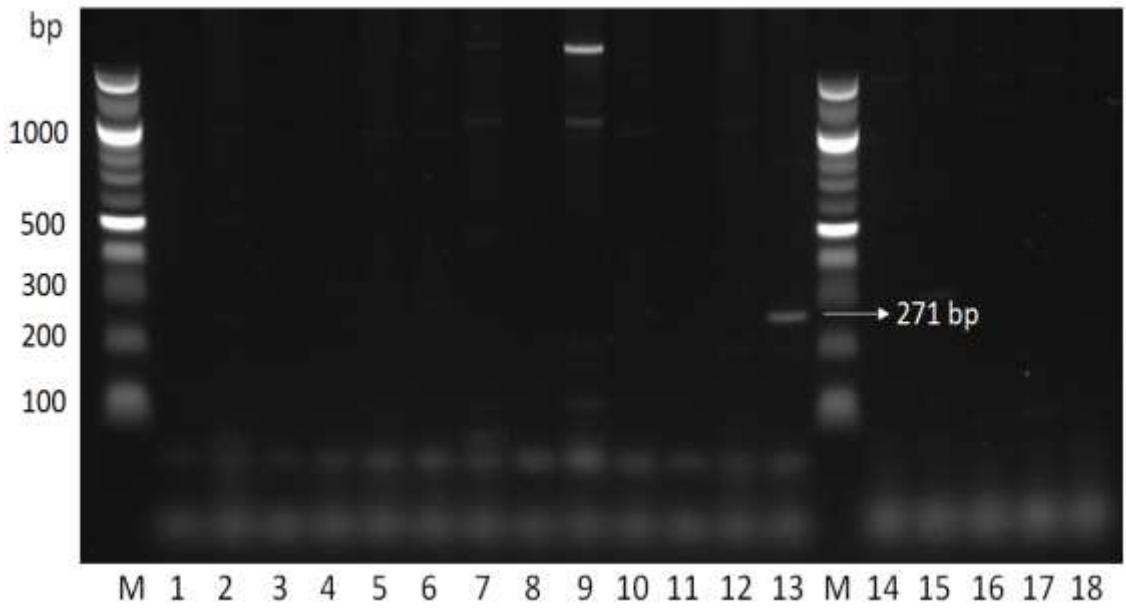
Çalışılan kökenlerde IMP, VIM, GES, GIM, SPM, OXA-51, OXA-23, OXA-10 grup genlerinin varlığını araştırmak amacıyla PZR yapıldı. Toplam 102 izolatın hiç birinde IMP, VIM, GES, GIM gen bölgeleri tespit edilemedi.

A. baumannii izolatlarının tamamında SPM, OXA-51 ve OXA-23 gen bölgelerinden en az bir tanesi pozitif bulundu. *P. aeruginosa*'da izolatların 16'sında (% 31); OXA-51 (% 18) ve OXA-10 (14) gen bölgelerinden en az bir tanesi pozitif bulundu. PZR ile pozitiflik saptanan gen bölgelerinin izolatlara göre dağılımı Tablo 15, Resim 8, 9, 10, 11 ve 12'de verilmiştir.

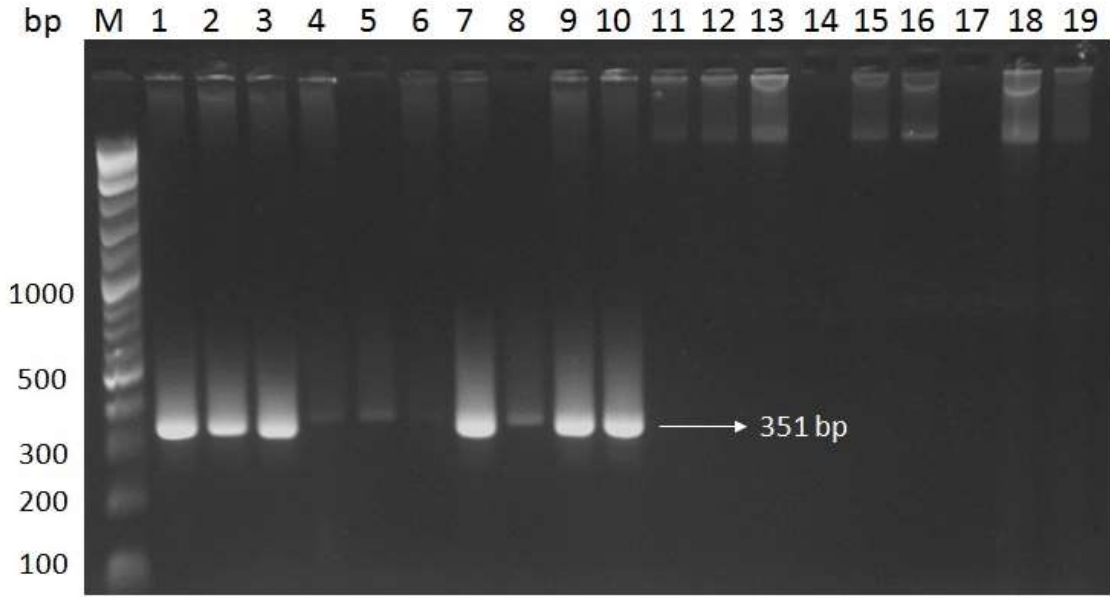
Tablo 15. PZR ile pozitiflik saptanan gen bölgelerinin izolatlara göre dağılımı

GENLER	<i>A. baumannii</i> (%) <i>n=51</i>	<i>P.aeruginosa</i> (%) <i>n=51</i>
SPM	2 (4)	-
OXA-51	50 (98)	9 (18)
OXA-23	39 (77)	-
OXA-10	-	7 (14)
OXA-23 ve OXA-51	39 (77)	-
SPM, OXA-23 ve OXA-51	2 (4)	-

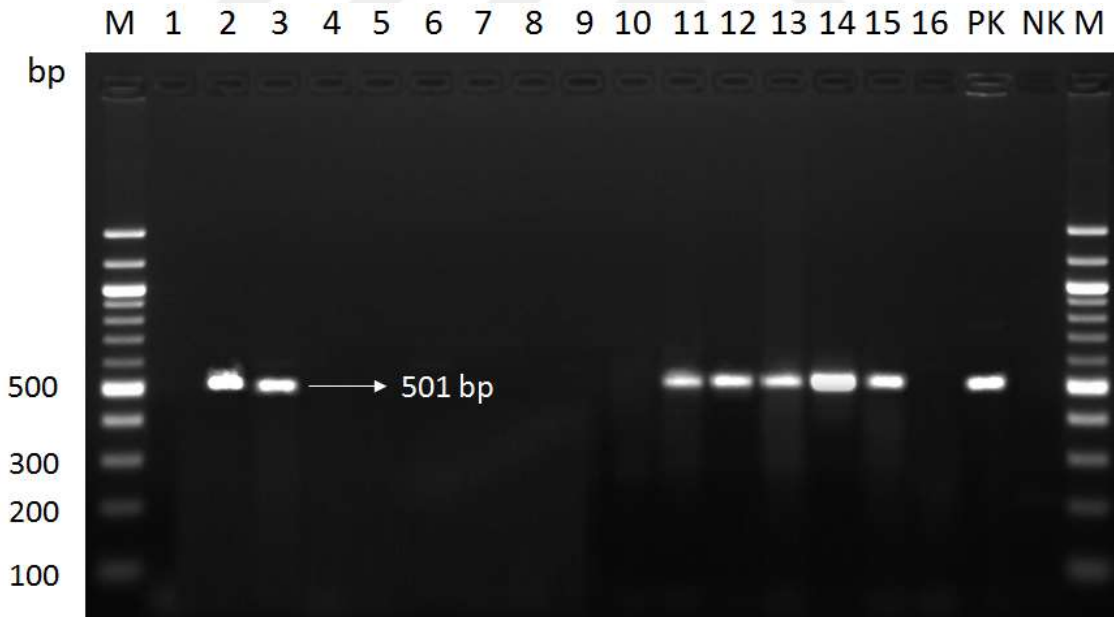
Resim 8. *A. baumannii* izolatlarında SPM pozitif gen bölgeleri.



Resim 9. *A. baumannii* izolatlarında OXA-51 pozitif gen bölgeleri.

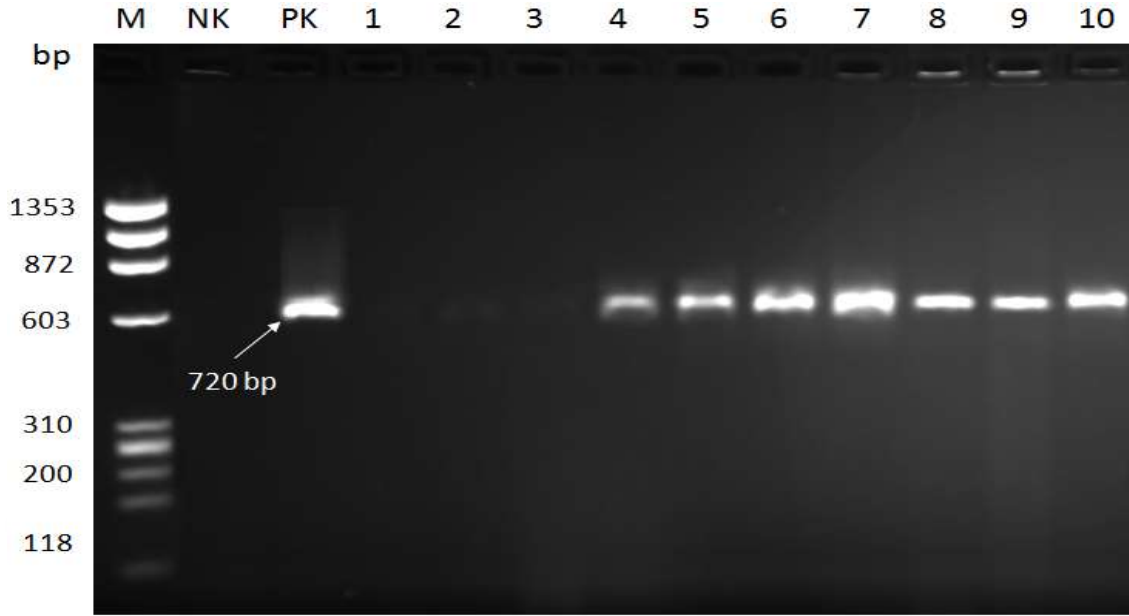


Resim 10. *A. baumannii* izolatlarında OXA-23 pozitif gen bölgeleri.



PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol, M: Marker

Resim 11. *P. aeruginosa* izolatlarında OXA-10 pozitif gen bölgeleri.



PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol, M: Marker

4.5. Fenotipik yöntemlerin PZR ile uyumunun karşılaştırılması

Fenotipik testlerin gold standart olan PZR sonuçları göz önünde bulundurularak uyum oranları tablo 16, 17, 18’de verilmiştir.

Tablo 16. Kombine Disk Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması.

		PZR		Toplam	
		+	-		
KDT	<i>A. baumannii</i>	+	48	0	48
		-	3	0	3
	Toplam	51	0	51	
<i>P. aeruginosa</i>	+	14	5	19	
	-	2	30	32	
	Toplam	16	35	51	

Tablo 17. Çift Disk Sinerji Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması

		PZR		Toplam	
		+	-		
ÇDST	+	0	0	0	
	<i>A. baumannii</i>	-	51	0	51
	Toplam	51	0	51	
	+	15	12	27	
<i>P. aeruginosa</i>	-	1	23	24	
	Toplam	16	35	51	

Tablo 18. Modifiye Hodge Testi sonuçlarının PZR ile karşılaştırılması

		PZR		Toplam	
		+	-		
MHT	+	39	0	39	
	<i>A. baumannii</i>	-	12	0	12
	Toplam	51	0	51	
<i>P. aeruginosa</i>	+	9	1	10	
	-	7	34	41	
	Toplam	16	35	51	

Fenotipik Yöntemlerin PZR ile karşılaştırmalı duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. Fenotipik testlerin PZR'deki tüm genlere göre dağılımı

İzolat Adı	Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Doğruluk (%)
<i>A. baumannii</i>	KDT	94	HE	HE	HE	94
	ÇDST	0	HE	HE	0	0
	MHT	76	HE	100	0	76
<i>P. aeruginosa</i>	KDT	88	86	74	94	86
	ÇDST	94	66	56	96	75
	MHT	56	97	90	83	84

KDT: Kombine Disk Testi ÇDST: Çift Disk Sinerji Testi MHT: Modifiye Hodge Testi PPD: pozitif Prediktiv Değer NPD: Negatif Prediktiv Değer HE: Hesap Edilemedi (PZR ile gen bölgesi saptanmayan negatif izolat olmadığından)

Rutin kullanımda *Acinetobacter baumannii* için duyarlılığı en yüksek test olarak KDT bulunmuştur. Ancak PZR ile tüm *Acinetobacter baumannii* izolatlarında en az bir gen pozitif bulunmuştur. MBL için gen bölgesi içermeyen izolat olmadığından testlerin özgüllüğü hesap edilememiştir. ÇDST'nin duyarlılığı % 0 olduğundan MBL analizi için uygun bir fenotipik test olmadığı görülmüştür.

Pseudomonas aeruginosa için ise duyarlılığı en yüksek testler sırasıyla ÇDST, KDT ve MHT olarak bulunmuştur. En yüksek özgüllüğe sahip testin ise MHT olduğu belirlenmiştir. Tümü dikkate alındığında doğruluğu en yüksek bulunan KDT rutin kullanım için daha uygun bulunmuştur.

4.6. *A. baumannii* izolatlarının PFGE sonuçları

Tiplendirilen 51 *A. baumannii* izolatında 38 farklı PFGE profili göstermiştir. Klonal yönden ilişkili izolatlar, 13 farklı küme içerisinde yer almaktadırlar. Toplam 51 *A. baumannii* izolatunun 41'i herhangi bir küme içerisinde yer almaktadır. İzolatların kümeleşme oranı % 80'dir.

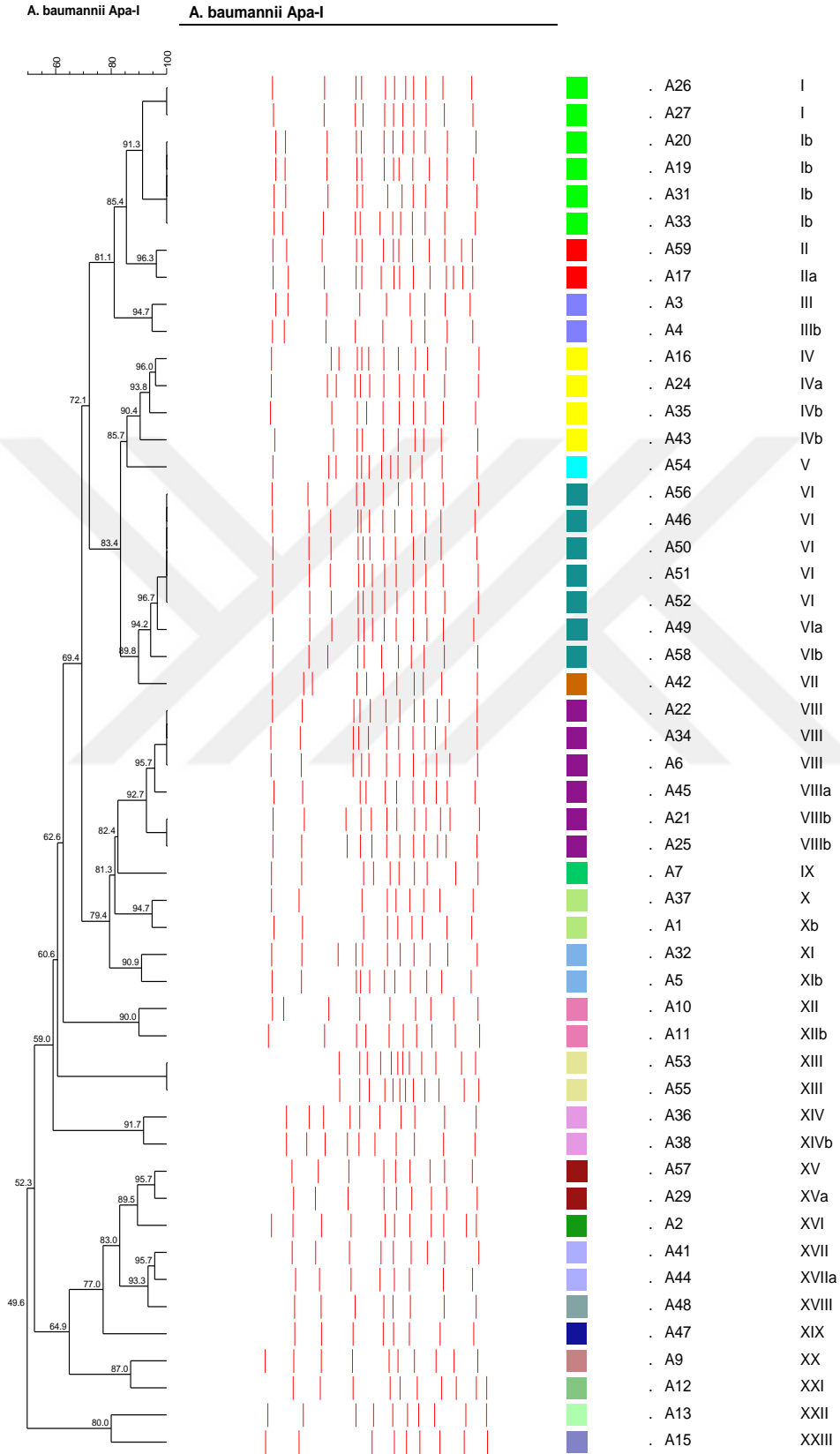
En büyük küme; 7 izolatin yer aldığı VI ile kodlanan kümedir. Bunu sırasıyla; I (6 izolat), VIII (6 izolat), IV (4 izolat), II (2 izolat), III (2 izolat), X (2 izolat), XI (2 izolat), XII (2 izolat), XIII (2 izolat), XIV (2 izolat), XV (2 izolat), XVII (2 izolat) kümeleri takip etmektedir (Şekil 1).

4.7. *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE sonuçları

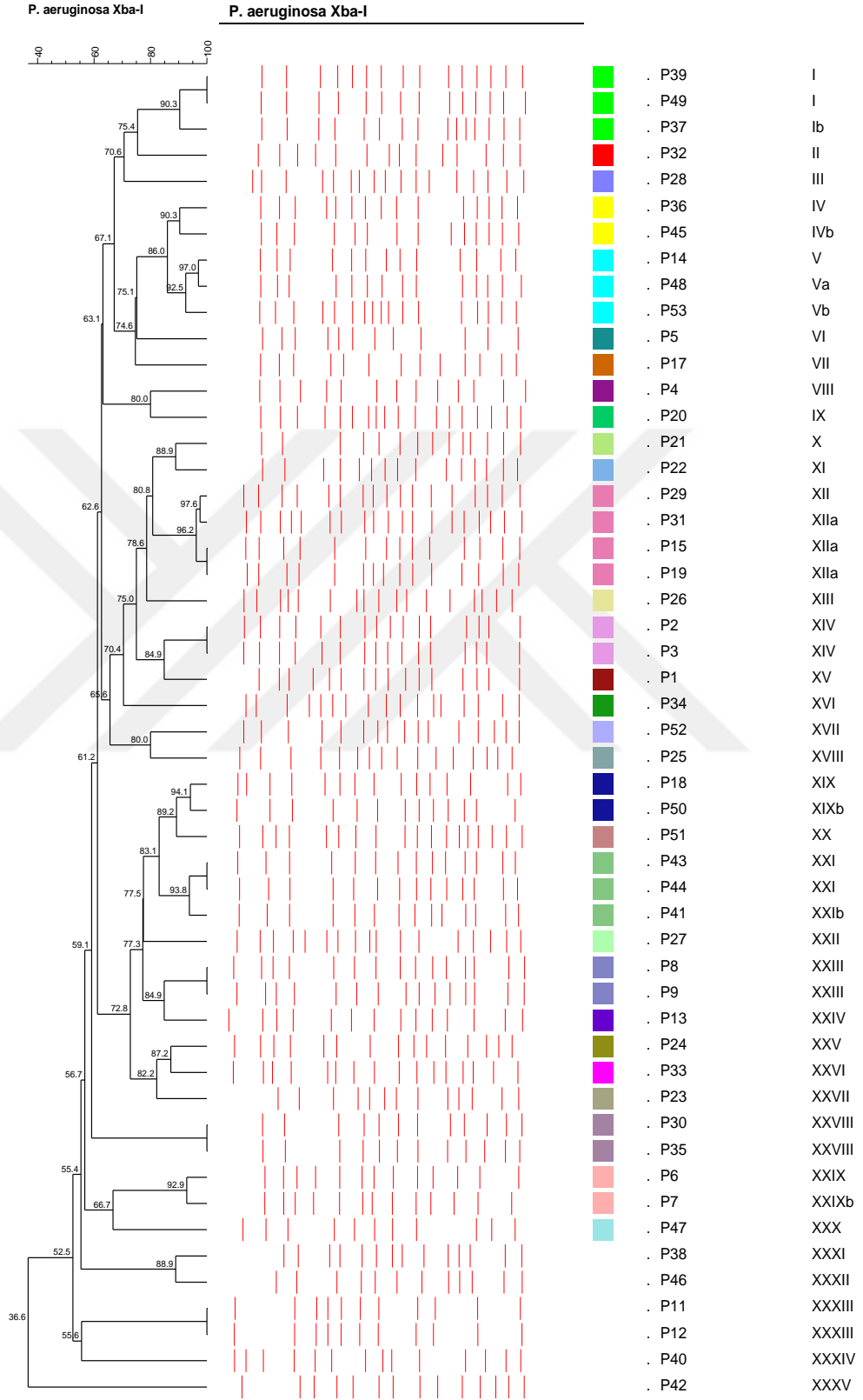
Tiplendirilen 51 *P. aeruginosa* izolatinın 43 farklı PFGE profili göstermiştir. Klonal yönden ilişkili izolatlar, 11 farklı küme içerisinde yer almaktadırlar. Toplam 51 *P. aeruginosa* izolatinın 27'si herhangi bir küme içerisinde yer almaktadır. İzolatların kümeleşme oranı % 53'tür.

En büyük küme; 4 izolatin yer aldığı XII ile kodlanan kümedir. Bunu sırasıyla; I (3 izolat), V (3 izolat), XXI (3 izolat), IV (2 izolat), XIV (2 izolat), XIX (2 izolat), XXIII (2 izolat), XXVIII (2 izolat), XXIX (2 izolat), XXXIII (2 izolat) kümeleri takip etmektedir (Şekil 2).

Şekil 1. *Acinetobacter baumannii* PFGE sonuçları.



Şekil 2. *Pseudomonas aeruginosa* PFGE sonuçları.



5. TARTIŞMA

Yoğun Bakım Üniteleri, invaziv girişimlerin sıklıkla yapıldığı birimlerdir. Bu girişimlere ilave olarak uzun süreli yatış tedavi olma, yanık tedavileri, immün yetmezlik, malignensi gibi altta yatan risk faktörleri, büyük cerrahi girişimler ve uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı hastane enfeksiyonları açısından risk oluşturmaktadır (150). *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi nonfermentatif bakteriler YBÜ'lerde sıklıkla karşımıza çıkan hastane enfeksiyonu etkenidirler. Bu mikroorganizmalar ÇİD olarak karşımıza çıkmakta ve bu izolatlarla oluşan enfeksiyonlar tedavi güçlüklerine neden olmaktadır. Ampirik tedavi de dahil olmak üzere bu etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda karbapenemler sıklıkla kullanılmakta ve bu durum karbapenem direncinde artış olarak kendini göstermektedir (153,154,155).

Karbapenem dirençli izolatlar, genellikle diğer antibiyotik gruplarına da direnç göstermektedir. Bu durum, tedavide güçlüğü ve dirence sebep olan genlerin başka bakterilere aktarılma olasılığını da artırmaktadır. Direnç genlerinin yayılmasına neden olan genetik yapılardan olan integronların varlığı ÇİD gelişimi açısından önemlidir. İntegron taşıyan *Acinetobacter* türleri taşımayanlara göre daha virulan ve antibiyotiklere dirençlidir. MBL veya karbapenemaz oluşturan izolatlarda integronlar vasıtası ile direnç geninin taşındığının gösterilmesi horizontal yayılım mekanizmasını desteklemektedir (156,157).

Gram negatiflerde karbapenem direnci son yıllarda oldukça tehlikeli boyutlara ulaşmıştır (158,159). Lye ve ark. 2008 yılında GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinde ilk basamak tedavide ortalama 11 günlük karbapenem uygulamasının *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direncini % 67 ve *P. aeruginosa* izolatlarında ise % 15 oranına çıkardığını göstermişlerdir (160). Özellikle nonfermentatif gram negatif basillerde karbapenem direnci daha yüksek oranlarda görülmekte ve hızla artarak dünya çapında yayılma göstermektedir (106,161). Karbapenemazlardan özellikle MBL'ler ilk olarak 1991'de Japonya'da MBL üreten bir *P. aeruginosa*'nın bildirilmesiyle tanımlanmıştır (162). Türkiye'de yapılan çeşitli araştırmalarda nonfermentatiflerde imipenem ve meropenem direnci % 40'lardan % 92'lere ulaşmıştır (163,164,165). Ülkemizde Gacar ve ark. *E. cloacea*'da VIM-5, Aktaş ve ark. *K.pneumoniae*'da IMP-1 ve Yıldırım ve ark. ise *K. pneumonia*'da VIM-1 karbapenemaz saptamışlardır

(166,167,168). Gür ve ark. SENTRY programı çerçevesinde ülkemizde 321 *A. baumannii* izolatında OXA-23 ve OXA-58 varlığını araştırdıkları çalışmada imipenem dirençli 44 izolatın 26'sında bla_{OXA-23}, 18'inde bla_{OXA-58} tespit etmişlerdir. Yedi yıllık süreci kapsayan bu çalışmada 2000-2008 yılları arasında karbapenem direncinde % 20 lardan % 60 lara varan oranda artış bildirilmiştir (169).

Karbapenem dirençli izolatlarda MBL varlığının güvenilir, kullanıma uygun, kolay, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir fenotipik ve/veya genotipik bir laboratuvar metoduyla tespiti, enfeksiyon kontrolü açısından oldukça önem kazanmıştır. MBL oluşturan izolatlarda fenotipik testlerin çoğu enzimin bir metal şelatörü tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır. Metal şelatör, enzim aktif bölgesindeki çinko iyonuna bağlanarak ayrılmasına ve enzimin inaktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu temele dayanarak yapılan testlerden ÇDST ve KDT bu prensibe dayanmaktadır. Substrat olarak imipenem kullanılırken, inhibitör olarak da EDTA/MPA/SMA kullanılmaktadır. EDTA ile yapılan testlerde EDTA'nın bakterisidal etkisine bağlı olarak yalancı pozitiflik yüksek olabilmektedir. Ayrıca her iki test için de değerlendirme subjektif olduğu için yorumlayan kişiye göre farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (170).

Sesli-Çetin ve ark. Isparta'da 2009 yılında MBL üretimini imipenem dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* kökenlerinde sırasıyla KDT ile % 75, % 62; ÇDST ile % 84, % 73; MHT ile % 74, % 58 olarak bulmuşlardır (171). Ulusoy-Al ve ark. 2011 yılında *A. baumannii* izolatlarında yürüttükleri çalışmada izolatların KDT ile % 58.2, ÇDST ile % 55.7, MHT ile % 69.6 oranında MBL ürettiklerini bildirmişlerdir (172). Çıkman ve ark.'nın hastanemizde 2011 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada KDT ile *A. baumannii* izolatlarının % 79'unun, MHT ile % 97'sinin MBL ürettiğini tespit etmişlerdir. İzolatların % 76'sında her iki test yöntemiyle de MBL üretimi saptamışlardır (173). Ülkemizde 7 farklı coğrafi bölgeyi temsil eden 8 ilden (Ankara, Konya, Antalya, İstanbul, İzmir, Diyarbakır, Van ve Trabzon) toplam 186 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökeninde MBL'nin varlığı KDT testi ile incelenmiştir. Bu test ile kökenlerin ortalama % 31.2 oranında MBL ürettiği saptanmıştır. MBL oranı en yüksek iller Antalya (% 52) ve İstanbul (% 50), en düşük Diyarbakır (% 6) olarak saptanmıştır (174). Bulut ve Çağlar, 2013 yılında Elazığ'da meropenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinde MBL üretimini KDT ile % 95, MP-EDTA ÇDST ile % 67.5 ve MHT ile % 72.5 olarak tespit etmişlerdir. Meropenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde ise

MBL üretimini KDT ile % 80, ÇDST ile % 100 ve MHT ile % 60 oranında bulmuşlardır (175). Altınöz-Aytar ve ark. 2015 yılında Düzce’de yaptıkları çalışmada gram negatif nonfermentatiflerde MBL oranını ÇDST ile % 34, KDT ile % 55 ve MHT ile % 45 olarak saptamışlardır (176). Yan ve ark. 2004 yılında *P. aeruginosa* izolatlarında KDT’ini % 87 duyarlılık, % 97 özgüllükte tespit etmişlerdir. Karbapenemaz oluşturan izolatlarda imipenemin MİK değeri ≤ 4 µg/ml ise KDT uygulanamayacağını bildirmişlerdir. MBL oluşturan izolatların imipenem MİK değeri ≥ 4 µg/ml olanlar KDT ile tanımlanabilmiştir (114). Bu çalışmada KDT ile *A. baumannii* için 48/51 (% 94), *P. aeruginosa* için 19/51 (% 37) pozitiflik göstermiştir. ÇDST ile *A. baumannii* için 0 (% 0), *P. aeruginosa* için 27/51 (% 53) pozitiflik bulunmuştur. MHT için ise *A. baumannii* için 39/51 (% 77), *P. aeruginosa* için 10/51 (% 20) pozitiflik saptanmıştır. ÇDST *P. aeruginosa* için 11 izolatta yalancı pozitiflik göstermiştir. Yalancı pozitifliğin nedeni kullanılan EDTA’nın tek başına özgül olmayan geniş inhibisyon zonu oluşturabilmesidir. Bu çalışmada imipenem-EDTA ile gerçekleştirilen ÇDST sadece *P. aeruginosa* için pozitiflik göstermiştir. Bu da *Pseudomonas*’larda enzim inhibitörü olarak EDTA kullanımının *Acinetobacter* izolatlarına göre daha anlamlı olabileceğini düşündürmüştür. Rutin kullanımda *A. baumannii* için duyarlılığı en yüksek test olarak KDT bulunmuştur. Ancak PZR ile tüm *Acinetobacter baumannii* izolatlarında en az bir gen pozitif bulunmuştur. MBL için gen bölgesi içermeyen izolat olmadığından testlerin özgüllüğü hesap edilememiştir. ÇDST’nin duyarlılığı % 0 olduğundan MBL analizi için uygun bir fenotipik test olmadığı görülmüştür. *P. aeruginosa* için ise duyarlılığı en yüksek testler sırasıyla ÇDST, KDT ve MHT olarak bulunmuştur. *P. aeruginosa* izolatlarında en yüksek özgüllüğe sahip testin ise MHT olduğu belirlenmiştir. Tümü dikkate alındığında doğruluğu en yüksek bulunan KDT rutin kullanım için daha uygun bulunmuştur.

A. baumannii izolatlarında MHT testinde yalancı negatiflik 12 (% 23) oranında bulunmuş; *P. aeruginosa* için yalancı negatiflik 7 (% 11) olarak bulunmuştur. Bu MHT’nin yalancı negatiflik oranının yüksek olması; her ne kadar kolay bir test gibi gözükse de yapan ve yorumlayan kişiye göre farklılık göstermesine bağlanmaktadır.

Shin ve ark. 2008 yılında 79 MBL pozitif ve 95 MBL negatif toplam 174 *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatında DPA-IPM KDT’nin duyarlılığını % 98.7 spesifitesini % 100, PPD’ini % 100 ve NPD’ini % 99 olarak bulmuşlardır. İMP-EDTA

KDT'nin ile duyarlılığını % 97.5 spesifitesini % 96.5, PPD'ini % 96.3 ve NPD'ini % 97.9 olarak belirtmişlerdir. ÇDST için duyarlılığı % 98.7 özgüllüğü % 88.4, PPD % 87.6 ve NPD % 98.8 olarak tespit etmişlerdir (177). Şimşek ve Sultan'ın yürüttükleri bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarında MHT referans alınarak ÇDST'nin duyarlılığı % 79, özgüllüğü % 89, PPD % 88, NPD % 80, KDT'nin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 74, PPD % 78, NPD % 100, olarak belirtilmiştir. *Acinetobacter* izolatlarında ise ÇDST duyarlılığı % 64, özgüllüğü % 91, PPD % 94, NPD % 56, KDT duyarlılığı % 91, özgüllüğü % 55, PPD % 80, NPD % 75, olarak belirtilmiştir (178). Bu çalışmada KDT'nin duyarlılığı % 94 ve doğruluğu % 94 olarak bulunmuştur. Özellikle *Acinetobacter* izolatlarında *Pseudomonas*'lara göre belirgin yüksek uyum göstermiştir. Uygulanması kolay, ucuz ve yorumu kişiden kişiye değişmeyen bir yöntem olmasından dolayı karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarında MBL varlığını araştırmada önerilebilecek bir fenotipik test olarak öne çıkmıştır. *P. aeruginosa* ÇDST'nin duyarlılığı % 94, özgüllüğü % 56, PPD % 66, NPD % 96, doğruluğu % 75 olarak tespit edilmiş. Fakat her ne kadar rutin uygulamalarda tercih edilebilecek fenotipik uygulamaları araştırmayı hedefleyen bu çalışmada PZR uyumu araştırılrsa da sadece 9 gen bölgesi bakıldığı için diğer genleri taşıyan izolatlara bu fenotipik yöntemleri genellemek uygun olmayabilmektedir.

PZR analizi ile MBL varlığını belirlemek güvenilir bir yöntem olarak bilinmekle beraber direnç genlerinin her zaman saptanamadığı yayınlara da rastlanmaktadır. Gibb ve ark. 2002 yılında bla_{VIM} ve bla_{IMP} primerlerini kullanarak *P. aeruginosa*'da IMP bulamadıkları halde genomik DNA'yı bir plazmide kodladıktan sonra yaptıkları sekans analizi ile bla_{IMP} varlığını saptayabilmişlerdir. OXA-51 *A. baumannii* izolatlarından 50'sinde *P. aeruginosa* izolatlarının ise 9'unda tespit edilmiştir. OXA-23, *A. baumannii* izolatlarının 39'unda tespit edilirken, OXA-10 ise sadece 7 adet *P. aeruginosa* izolatında tespit edilebilmiştir (179). Yine Ulusoy-Al ve ark. 2011 yılında *A. baumannii* izolatlarında yürüttükleri çalışmada KDT ile 46'sının (% 58.2), ÇDST ile 44'ünün (% 55.7), MHT ile 55'inin (% 69.6) MBL saptadıklarını tespit etmişlerdir. PZR yöntemiyle bla_{IMP-1} geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır. PFGE ile 10 farklı bant paterni görülmüş ve fenotipik testlerle MBL pozitif bulunan izolatların A ve C gruplarında yoğunlaştıklarını gözlemlemişlerdir (172).

Kore’de 99 *P. aeruginosa* ve 31 *A. baumannii* olmak üzere 130 izolatta MBL araştırmak için yürütölen araştırmada 33 izolatin (29 *P. aeruginosa* ve 4 *A. baumannii*) bla_{VIM-2} taşıdığı ve iki *P. aeruginosa* izolatinın da bla_{IMP-1} taşıdıkları belirlenmiştir (180). Komşularımızdan Yunanistan’da VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-12, VIM-17 ve VIM-27 tipi MBL tanımlanmıştır (181). İnan’da da VIM tipi MBL bildirimleri mevcuttur (182). Karbapenem direncini belirlemek amacıyla Hacettepe Üniversitesinde gerçekleştirilen bir çalışmada 110 *P. aeruginosa* izolatinın 11’inde bla_{VIM} pozitif bulunmuştur. Yine tüm izolatlara bla_{IMP} bakılmış ve negatif olarak tespit edilmiştir (183). Özgümüş ve ark. Karadeniz Teknik Üniversitesinden elde ettikleri izolatlarda gerçekleştirdikleri çalışmada VIM ve SPM genlerini *Pseudomonas*’larda saptamışlardır (184). Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi’nde gerçekleştirilen bir çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinin tümünde yapılan PZR ve multipleks PZR yöntemleri sonucunda MBL üretiminden sorumlu NDM-1, IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1 enzimleri negatif bulunmuştur (185). Bizim alışmamızda IMP, GIM, GES ve VIM genleri çalışılan tüm izolatlarda negatif bulunmuştur.

Çin’de 2010 yılında OXA-23 üreten *A. baumannii* salgını raporlanmıştır (186). Nijerya’da ise 2013 yılında imipenem-dirençli *A. baumannii* izolatinın % 60 OXA-23 varlığı belirtilmiştir (187). İnan’da 2015 yılında gerçekleştirilen çalışmada bla_{OXA-23} ve bla_{VIM} gen varlığı sırasıyla % 83 ve % 12.5 olarak ortaya konmuştur (188). Turton ve ark. 2006 yılında İngiltere’de yaptıkları çalışmada, multipleks PZR yöntemi ile *A. baumannii* izolatlarda OXA-51, OXA-23 ve Class 1-integraz kodlayan genler araştırılmış ve izolatlarda OXA-51 kodlayan gen belirlenmişlerdir. Bu bizim çalışmamızla uyumludur (189).

Gördebil yüksek lisans tez çalışmasında incelediği 55 izolatin tamamında (% 100) OXA 51 ve ISAb₁ geni tespit etmişlerdir. İzolatlarda 4’ünde (% 7.27) OXA 58, OXA 51 ve ISAb₁, 3’ünde (% 5.45) OXA-24, OXA-51 ve ISAb₁ geni belirlenmişken OXA 23 geni hiç bir izolatta bulunmamıştır (190). Ülkemizde 2008 yılında 7 yıllık periyod dahilinde yapılan çalışmada Ankara ve İstanbul’dan toplanan 321 *A. baumannii* izolatinın OXA-23 ve OXA-58 varlığı araştırılmış toplam 44 izolatin 26’sında OXA-23 (% 59.1) ve 18’inde (% 40.9) OXA-58 tespit edilmiştir. OXA-23 taşıyan izolatlarda 1 tanesi İstanbuldan diğerleri Ankara’dan izole edilmiştir. OXA-58 pozitif izolatlarda tamamı Ankara’dan izole edilmiştir (169). Çeşitli illerdeki (Afyonkarahisar, Ankara,

Bolu, Elazığ, Erzurum, Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş, Konya, Sakarya, Van) 13 üniversite ve devlet hastanesinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, 2008-2011 tarihleri arasında izole edilen toplam 834 *A. baumannii* klinik izolatının dahil edildiği çalışmada karbapenem dirençli izolatların bla_{OXA-23-like} ve bla_{OXA-58-like} gen pozitiflikleri ise sırasıyla % 74.4 ve % 17.3 olarak tespit edilmiştir. Yirmi beş izolat hem bla_{OXA-23-like} hem de bla_{OXA-58-like} gen pozitifliği göstermiştir. bla_{OXA-24-like} hariç, karbapenem dirençli izolatların tamamında OXA tipi genler saptanmıştır (150). Keskin ve ark.'nın 2014 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada bütün 201 *A. baumannii* izolatının hepsinin (% 100) bla_{OXA-51} geni taşıdığı görülmüş; 184'ünün (% 91.5) bla_{OXA-23}, 7'sinin (% 3.5) bla_{OXA-58} ve 2 (% 1)'sinin bla_{OXA-24} genine sahip olduğu belirlenmiştir. Örneklerin hiçbirinde bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{SIM}, bla_{NDM} genleri saptanamamıştır (190). Taşbent-Esenkaya ve Özdemir 2015 yılında Konya ilinde yürüttükleri çalışmada karbapenem dirençli 184 *Pseudomonas* izolatından 12'sinde OXA-23, 1 izolatta OXA-40 ve 1 izolatta da OXA-58 geni olmak üzere toplam 14 izolatta (% 7.6) pozitiflik bulmuşlardır. Ülkemizde *Pseudomonaslar*'da ilk OXA tipi karbapenemaz varlığının gösterilmesi açısından bu çalışma önemli olmuştur (191). Bizim çalışmamıza dahil edilen izolatlardan *A. baumannii*'de OXA-51 (% 98), OXA-23 (% 77), OXA-23 ve OXA-51 birlikteliği (% 77), SPM, OXA-23 ve OXA-51 birlikteliği (% 4) ve SPM (% 4) olarak bulunmuştur. *P. aeruginosa* izolatlarında OXA-51 (% 18) ve OXA-10 (% 14) tespit edilmiştir.

Wang ve ark. 1999–2005 yılları arasında 11 hastanede 221 imipenem dirençli *Acinetobacter* izolatını PFGE ile tiplendirdikleri çalışmada; iki veya daha fazla subtipten oluşan 15 patern tanımlamışlardır. Bu çalışma periyodu esnasında dört şehirde 10 hastanede klonal yayılım saptanmıştır. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasına rağmen hastanenin farklı 19 servisinde imipenem dirençli klon izolatları bulunmuştur (192). Prashanth ve ark.'nın yaptıkları çalışmada yoğun bakımlarda üreyen 71 *Acinetobacter* izolatını PFGE ile tiplendirmişler, 59 (% 83) farklı patern belirlemişlerdir (193). Khoo ve ark. 2010 yılında yayımladıkları araştırmada Singapur'da 2.552 adet *P. aeruginosa* izolatının 123'ünde karbapenem direnci tespit etmişlerdir. Bunun da dokuzunda MBL tespit etmişlerdir. Yapılan PFGE analizinde bla_{IMP-1} ve bla_{IMP-7} ait olmak üzere iki klonal varyantta toplandığını bulmuşlardır (194). Lucena ve ark. bir hastane enfeksiyonunu değerlendirdikleri çalışmada klonal genotipin SMP-1

P. aeruginosa izolatlarından oluştuğunu ve klonalite oranının % 70 olduğunu bildirmişlerdir (195).

Ülkemizde Ayan ve ark.'nın 38 *A. baumannii* izolatu ile yaptıkları epidemiyolojik çalışmada izolatların PFGE ile dokuz farklı grupta toplandıkları, PFGE analiz sonuçlarının epidemiyolojik ve klinik verilerle en iyi korelasyonu gösterdiğini saptamışlardır (196). Gördebil ve ark. karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarının PFGE ile klonal ilişkilerinin incelemesi sonucunda, 55 izolatın 29 (% 52.7)'unun yakın ilişkili olduğu ve aynı klondan köken aldığını bildirmişlerdir (197). Bu çalışmada tiplendirilen 51 *A. baumannii* izolatu 38 farklı PFGE profili göstermiştir. Klonal yönden ilişkili izolatlar, 13 farklı küme içerisinde yer almaktadırlar. Toplam 51 *A. baumannii* izolatının 41'i herhangi bir küme içerisinde yer almaktadır. İzolatların kümeleşme oranı % 80 olarak bulunmuştur. PFGE tiplendirmesinin sonucunda hastanemizdeki *Acinetobacter spp.* izolatlarının oldukça yüksek bir kısmının klonal yönden ilişkili oldukları saptanmıştır. Tüm izolatlar MDR olarak bulunmuştur. Çekin ve ark. 2012 yılın ilk dört ayında izole edilen salgın ilişkili endemik dönem *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotipleri benzer (0-1 izolat/ay) saptanması çevresel kaynaklara yönlendirmiştir. İlk haftada görülen A pulstipine ait izolatın 16. haftanın sonuna kadar varlığını sürdürdüğü belirlenmiştir. B, C, D pulstiplere ait izolatlara da hastanede de salgın boyunca hastanede rastlanmıştır (198). Yetkin ve ark. 105 *P. aeruginosa* izolatında 1 yıllık periyota 80 hasta örneğinde gerçekleştirdikleri çalışmada 28 izolatın klonal ilişki gösterdiği bu 26 izolatında 9'u tekrarlayan enfeksiyon olarak belirlenmiştir (199). Nozokomiyal patojenlerin hastanede kolayca yayılabildiğini ve uygun korunma ve kontrol önemlerinin alınmaması halinde yıllarca hastane ortamında kalabileceğini vurgulanmalıdır. Genel olarak ortak direnç ve PFGE profili gösteren izolatlarda direnç yayılımının klonal yayılıma paralel olduğu kabul edilmektedir (200,201). Çalışmamızda tiplendirilen 51 *P. aeruginosa* izolatu 43 farklı PFGE profili göstermiştir. Klonal yönden ilişkili izolatlar, 11 farklı küme içerisinde yer almaktadırlar. Toplam 51 *P. aeruginosa* izolatının 27'si herhangi bir küme içerisinde yer almaktadır. Her ne kadar *Acinetobacter*'ler kadar yüksek bir klonal ilişki görülmesede şuşların kümeleşme oranı % 53'tür. PFGE analizi için kronolojik olarak sıralanması yapılmış ve aynı klona ait izolatların hastanemizde uzun süre varlığını sürdürebildiği belirlenmiştir (A6-A45, A16-A43, A17-A59, P14-53, P18-P50).

Özetlenecek olursa, bu çalışmada imipenem ve meropenem dirençli bulunan izolatlarda karbapenemaz varlığının araştırılmasında test ettiğimiz üç çeşit fenotipik test arasında PZR ile uyumu en güvenilir test olarak KDT testi gösterilebilir. Fakat halen laboratuvar koşullarında uygulanması basit ve yorumlanması kişiden kişiye değişmeyen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek fenotipik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. PZR değerlendirmesinde toplam 102 izolatın hiç birinde IMP, VIM, GES, GIM gen bölgeleri tespit edilememiştir. *A. baumannii* izolatlarının tamamında en az bir gen bölgesi pozitif olmak üzere %98'i OXA-51, %77'si OXA-23 ve %4'ünde SPM geni pozitif bulunmuştur. Bu izolatlarda; %77 oranında OXA-23 ile OXA-51 ve %4 oranında OXA-23, OXA-51 ile SPM birlikteliği saptanmıştır. *P. aeruginosa*'da izolatların 16'sında (% 31); OXA-51 (% 18) ve OXA-10 (14) gen bölgelerinden en az bir tanesi pozitif bulundu. PFGE tiplendirmesinde *A. baumannii* kümeleşme oranı % 80 bulunurken *Pseudomonas*'larda bu oran % 53 olarak bulunmuştur. Klonal ilişki oranlarının yüksekliği hastanemizdeki hastalar arasında izolatların bulaş derecesinin oldukça yüksek olduğunu, hastanedeki klonun uzun periyotlarda ortamda kalabildiğini ortaya koymuştur. Bu durumda moleküler tiplendirme çalışmalarının desteğini alarak hastanemizde daha etkili bir korunma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekliliği ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

- 1-Siegel JD, Rhinehart RN, Jackson M, Chiarello L. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of MDROs in healthcare settings. CDC; 1-74, 2006.
- 2-Guideline for prevention of nosocomial pneumonia. Centers for Disease Control and Prevention. Respir Care; 39: 1191, 1994.
- 3-Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother; 39: 1211-33, 1995.
- 4-Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers, J Clin Microbiol; 49(2): 718-21, 2011.
- 5-Sarı H. Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenemEDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge test ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2005.
- 6-Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 26. Baskı, 245, Mc Graw Hill, New York, 2001.
- 7-Winn WAS, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The nonfermentative Gram-negative bacilli, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6.ed. Lippincott Williams and Wilkins, Washington; 390-475, 2006.
- 8-Eraksoy H. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics; 4(1): 1-14, 2011.
- 9-Altunok ES, Koç MM. Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen *Acinetobacter* Suşlarının Yıllara Göre Antibiyotik Direnç Oranlarının Karşılaştırılması. ANKEM Derg; 28(1): 1-7, 2014.

- 10-Bergogne-Berezin E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram-negative bacilli. In: Cohen J, Powerly W (eds). Infectious Diseases. 2nd ed. New York: Mosby; 2203-17, 2003.
- 11-Winn J, Stephen A, William J, Elmer K, Gary P, Schreckenberger P. Gail Woods Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Washington. Altıncı baskı, Lippincott Williams & Wilkins; 353-355, 2006.
- 12-Bergogne-Berezin E. Importance of *Acinetobacter spp.* Ed: Bergogne-Berezin E. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis; 1-85, Springer, Paris, France 2008. Seifert H, 13-Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine*; 74: 340-349, 1995.
- 14-Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol*; 95: 1520-1541, 1968.
- 15-Bilgehan H. Non Fermentatif Gram Olumsuz Mikroorganizmalar. Klinik Mikrobiyoloji Barış Kitabevi, İzmir: 161-178, 1995.
- 16-Schreckenberger PC, Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moroxella*, *Methylobacterium* and Other Nonfermantative gram negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Seventh ed. Washington DC. ASM; 539-60, 1999.
- 17-Koneman W.E, Procop W.G, Schreckenberger C.P, Woods L.G. Nonfermentative Gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, Philadelphia: 8th ed. Lippincott Williams& Wilkins; 7: 303-391, 2006.
- 18-Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* As Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev*; 9: 148-65, 1996.
- 19-Akalın H. Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. Doğanay M, Ünsal S. Hastane İnfeksiyonları. Ankara Bilim Tıp Yayınevi; 269-89, 2003.
- 20-Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK. Global challenge of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 3741-3784, 2007.

- 21-Yıldız O. Çoğul Dirençli Gram Negatiflerde Tedavi Yaklaşımları. *Acinetobacter* Türleri. Yoğun Bakım Dergisi; 7: 144-50, 2007.
- 22-Doğan M, Esenkaya-Taşbent F, Feyzioglu B, Baykan M. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinin Kolistin, Tigesiklin Ve Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Araştırılması. ANKEM Derg; 28(4): 138-143, 2014.
- 23-Arda B. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* Olgusu. ANKEM Derg; 24(2): 78-81, 2010.
- 24-Aygün G. Yoğun Bakım Birimlerinde Antibiyotik Direnç Problemi ve Tedavide Güncel Durum: Nonfermentatifler (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Türk yoğun Bakım Dergisi; 5: 25-28, 2007.
- 25-Aydın, F. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobilyallere duyarlılıklarının araştırılması. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001.
- 26-Erdem B. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji: *Pseudomonas*'lar, Ustaçelebi Ş. ed Güneş Kitapevi, Ankara; 551-558, 1999.
- 27-Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases 6th ed Philadelphia: Churchill Livingstone; 2587-2614, 2005.
- 28-Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW eds Infectious Diseases. Second ed Toronto; 1733-48, 2004.
- 29-Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Nordmann P. GES-2 a class beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother; 45(9): 2598-603, 2001.
- 30-Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother; 32(1): 134-6, 1988.
- 31-Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother; 45(2): 447-53, 2001.

- 32-Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 43(6): 1362-6, 1999.
- 33-Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45(6): 1615-20, 2001.
- 34-Azık ET, Doğru Ü, Güriz H, Aysev AD, Erdal İnce, Çiftçi E. Çocuklarda *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları. *Çocuk Enf Derg*; 1: 1-5, 2007.
- 35-Çolak D. Genel Bakteriyoloji: Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. In Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara Güneş Kitabevi: 81-89, 1999.
- 36-Essack SY. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical Research* 2001; 18: 1391-9.
- 37-(<http://www.cic.klte.hu/~gundat/betalaca.htm>) 02.11.2015.
- 38-Chambers HF. Penicillins. Mandel GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill and Livingstone, Philadelphia; 5:261, 2000.
- 39-Naito T, Aburaki S, Kamachi H, Narita Y, Okumura J, Kawaguchi H. Synthesis and structure-activity relationships of a new series of cephalosporins, BMY-28142 and related compounds. *J Antibiot (Tokyo)*; 39: 1092-1107, 1986.
- 40-Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997; 1: 38-45.
- 41-Ulusoy S. Antibiyotikler. Ekim N, Uçan ES. *Solunum sistemi İnfeksiyonları*, 1. Baskı, Toraks Kitapları, Ankara; 125, 2002.
- 42-Herdman DJ, Gerding DN. Antimicrobial resistance among *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemoter* 1991; 35: 1.
- 43-Progulske-Fox A. Bacterial Structure. In Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Medical Microbiology*, 2.Ed, St Louis, Missouri, Mosby-Year Book Inc; 6, 1994.
- 44-Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Beta Laktam Antibiyotikler II: Sefalosporinler ve Diğerleri. 8. Baskı, Ankara Hacettepe-Taş kitapçılık Ltd Şti; 226, 1998.
- 45-Harold CN. Aztreonam Activity. *Pharmacology and Clinical Use*. *Ame J Med*; 88: 2-6, 1990.

- 46-Chambers HF, Neu HC, Other beta laktam antibiotics. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of infectious diseases, 4. Ed., New York, Churchill, Livingstone: 264-272, 1995.
- 47-Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, Macdonald JS. Carbapenems, a new class of beta laktam antibiotics. Ame J Med; 78: 3-21, 1985.
- 48-Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in gram negative bacteria: New challanges for new drugs. Clin Infect Dis; 14: 1089-1099, 1992.
- 49-Livermore DM, Williams JD. B-lactams: Mode of Action and Mechanism of Bacterial Resistance. In Lorian V ed Antibiotica in Laboratory Medicine. Williams&Wilkins, Baltimore; 502-78, 1996.
- 50-Murray BE. New Aspects of Antimicrobial Resistance and the Resultin Therapeutic Dilemmas. J Infect Dis; 163: 1185-1194, 1991.
- 51-Jacoby GA, Archer GL. New Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial agents. New Engl J Med; 324: 601-12, 1991.
- 52- Bush K. Classification of β -Lactamases: group 1, 2a, 2b and 2b. Antimicrob Agents Chemother; 33: 264-270, 1989.
- 53-Malouin F, Bryan LE. Modification of Penicillin-binding proteins as Mechanism of Beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother: 30; 1-5, 1986.
- 54-Pechere JC, Köhler T. Patterns and models of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect; 5: 15-18, 1999.
- 55-Neu HC, Relation of Structural Properties of β -lactam antibiotics to antimicrobial activity. Am J Med; 79: 1-13, 1985.
- 56-Bradford PA, Extended-spectrum beta-lactamases in 21. Century: Charectarization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev; 14: 933-51, 2001.
- 57-Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi;1:80-6,1996.
- 58-Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmiddetermined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother; 46: 1-11, 2002.
- 59-Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plazmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;13(1):17-29,1994.
- 60-Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 1. Baskı, İzmir. Güneş Kitapevi; 91-107, 1999.

- 61-Mederios AA. B-lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect*; 3(14): 2-9, 1997.
- 62-Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L et al. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. *J Med Microbiol*; 43: 294-99, 1995.
- 63-Hall LMC, Livermore DM, Gür D et al. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2)-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob agents Chemother*; 37: 1637-44, 1993.
- 64-Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA- 14, Another extended-spectrum variant of OXA- 10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 1881-4, 1995.
- 65-Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA- 15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β - lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 785-90, 1997.
- 66-Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA- 16, a further extended-spectrum variant of OXA- 10 β -lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 3117-22, 1998.
- 67-Danel F, Hall LMC, Duke B, Gür D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1362-6, 1999.
- 68-Aktaş Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persist in *Klebsiella pneumoniae* in İstanbul, Turkey, *Chemotherapy*; 54(2): 101-6, 2008.
- 69-Brown S, Amyes S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: The story so far. *J Antimicrob Chemother*; 57: 1-3, 2006.
- 70- Paetzel M, Danel F, De Castro L, Mosimann SC, Page MG, Strynadka NC. Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol*; 7: 918-925, 2000.
- 71-Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-Hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 223-32, 1997.
- 72-Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM, Dideberg O. A metallo- β -lactamase enzyme in action: Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase Cph A and its complex with biapenem. *J Mol Biol*; 345: 785-95, 2005.

- 73-Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin Microbiol Rev; 18(2): 306-325, 2005.
- 74-Amyes SGB. Carbapenemases. ANKEM Dergisi 1997; 11(2): 221-5.
- 75-Massida O, Rosssolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophilia* CphA gene: molecular heterogeneity among Class B Metallo- β -Lactamases. J Bacteriol; 173: 4611-17, 1991.
- 76-Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis; 27(1): 32-41, 1998.
- 77-Li Z, Nikaido H, Poole K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 39:1948-53,1995.
- 78-Pumbwe L, Piddock LJW. Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 44: 2861-4, 2000.
- 79-Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. Expression of multidrug resistance operon mexA-mexB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*; mexR encodes a regulator of operon expression. Antimicrob Agents Chemother; 40: 2021-8, 1996.
- 80-Bongfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in Carbapenems. Expert Opin Invest Drugs; 11(4): 529-44, 2002.
- 81- Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim S, Kang MW, Kim BK. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. Journal of Microbiological Methods; 54: 411-8, 2003.
- 82-Tetik T. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo beta-laktamaz enzim aktivitesinin araştırılması. Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık tezi, Isparta 2008.
- 83-Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 35: 147-151, 1991.
- 84-Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N and Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene bla_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother; 39: 1612-1615, 1995.

- 85-Laurettil L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1584-1590, 1998.
- 86-Scolica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of bla_{VIM-1} producing *E.coli* in a University Hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla_{VIM-1} Metallo- β -Lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 48: 167-172, 2004.
- 87-Poierel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing Metallo- β -Lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg infect Dis*; 6: 84-85, 2000.
- 88-Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*; 45(8): 2224-8, 2001.
- 89- Giske CG, Rylander M, Kronvall G. VIM-4 in a Carbapenem-Resistant Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother*; 47(9): 3034–3035, 2003.
- 90-Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R G, Rossolini M and Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*; 54: 282-283, 2004.
- 91-Koh TH, Wang GCY, Sng LH. IMP-1 and a Novel Metallo- β -Lactamase, VIM-6, in Fluorescent *Pseudomonas* Isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*; 48(6): 2334–2336, 2004.
- 92-Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*; 42(11): 5094-101, 2004.
- 93-Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A, Gutkind G. Abstr. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC; 293, 2004.
- 94-Simm AM, Toleman MA, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin

- America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*; 50: 673-679, 2002.
- 95-Poirel L, Magalhaes M, Lopes, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene bla_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 1406-1409, 2004.
- 96-Simm AM, Toleman MA, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*; 50: 673-679, 2002.
- 97-Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical Characterization of the acquired Metallo- β -Lactamase SPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 1406-09, 2004.
- 98-Hamprecht A, Poirel L, Göttig S, Seifert H, Kaase M, Nordmann P. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *J Antimicrob Chemother*; 68(3): 558-61, 2013.
- 99-Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology*;3:117-127,2002.
- 100-Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical impact and Therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*; 39(2): 105-14, 2012.
- 101- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: A problem in waiting? *Current Opinion Microbiology*; 3: 489-495, 2000.
- 102- Bush K. Metallo- β -lactamases: A class apart. *Clinic Infectious Disease*; 48-53, 1998.
- 103-Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamases gene bla_{SPM-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in recife. Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 1406-1409, 2004.
- 104-Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases, *J Antimicrob Chemother*; 57(3): 373- 83, 2006.

- 105-Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother*; 54(1): 24-38, 2010.
- 106-Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, *Clin Microbiol Infect*; 8(6): 321-31, 2002.
- 107-Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA Double-Disk-Synergy test for metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*. *Journal of Clinical Microbiology*; 41: 4623-4629, 2003.
- 108-Osaka K, Ishino Y, Daiyasu H, Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett*; 53: 1-6, 2002.
- 109- Yuan X, Toney JH, Ashton WT, Hutchins SM, Vanderwall DE, Clearly KA, May WJ. Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo- β -lactamase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*; 9: 2741-46, 1999.
- 110-Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organisation, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*;74:1686-701,2007.
- 111-Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett*; 503: 1-6, 2001.
- 112-Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, Concha NO, Janson CA et al. Identification of a series of tricyclic natural product as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 1880-86, 2002.
- 113-Buynak JD, Chen H, Vogeti L, Gadachanda VR, Buchanan CA, Palzkill T, Shaw RW, Spencer J, Walsh TR. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo and serine- β -lactamases. *Bioorg Med Chem Lett*; 14: 1299-304, 2004.
- 114-Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk combined disk, and E test methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 49 (1): 5-11, 2004.
- 115-Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA Double-Disk-Synergy test for metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*. *Journal of Clinical Microbiology*; 41: 4623-4629, 2003.

- 116-Walsh TR, Balmström A, Owarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*; 40: 2755-9, 2002.
- 117- Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol*; 26: 233–7, 2008.
- 118-Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. et al. Rapid identification of metallo and serine- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*;38:991-96,1994.
- 119-http://www.tmc-online.org/userfiles/sunumlar/09_Kas/Zeynep_Gulay.pdf
09/11/2015.
- 120-Mohamed NM, Raafat D. Phenotypic and Genotypic Detection of Metallo-beta-lactamases in Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from a Tertiary Hospital in Alexandria, Egypt. *Research Journal of Microbiology*; 6: 750-760, 2011.
- 121-Lv J, Wu S, Wei L, Li Y, He P, Lv J, Huang R. Salmonella enteric serovar Typhi plasmid pRst98, mediated inhibition of autophagy promotes bacterial survival in infected fibroblast. *Ind J of Med Microbiol*; 30(4): 423–30, 2012.
- 122- Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Hsueh PR, Chang FY, Siu LK et al. Emergence and distribution of plasmids bearing the bla oxa 51 like gene with an upstream ISA ba I in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents and Chemother*; 54(11): 4575–81, 2010.
- 123-Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. et al. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*; 18: 306-25, 2005.
- 124-Zaidi N, Konstantinou K. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med*; 127: 1098-105, 2003.
- 125-Nordmann P, Mulvey MR: Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum betalactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 3758–3764, 2004.
- 126-Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth Edition, Eds: Murray PR,

- Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. American Society for Microbiology Washington DC; 190–208, 1995.
- 127-Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing microorganisms. *J Clin Microbiol*; 37: 1661-1669, 1999.
- 128-Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Jpn J Infect Dis*; 62(5): 372-7, 2009.
- 129-Othman AB, Zribi M, Masmoudi A, Abdellatif S, Lakhall SB, Fendri C. Multiresistance and endemic status of *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infections in a tunisian hospital: a critical situation in the intensive care units. *Braz J Microbiol*; 42(2): 415–422, 2011.
- 130-Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene bla_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. *Clin Infect Dis*; 41(11): 1549-1556, 2005.
- 131-MA, Hollis RJ. Automated ribotyping. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington DC ASM Press; 245-58, 2004.
- 132-Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*, *Clin Microbiol Infect*; 18(9): 907-13, 2012.
- 133-Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter species*, *IUBMB Life* 2011; 63(12): 1061-7.
- 134-Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother*; 54(1): 24-38, 2010.
- 135-Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, Vazquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico, *Antimicrob Agents Chemother*; 54(3): 1354-7, 2010.
- 136-Köksall F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. In: Durmaz R editor, *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu 2*. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri;15-34,2001.

- 137-Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA editors: Molecular Diagnosis. Medical Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 17: 177-181, 2005.
- 138- www.mlst.net 2010. 05/11/2015
- 139-Baldwin A, Loughlin M, Caubilla B, Kucerova E, Manning G, Dowson C, Forsythe S. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. BioMed Central Microbiol; 9: 223,2009.
- 140-Öztürk R. Hastane enfeksiyonları kontrolünde moleküler mikrobiyoloji metotlarının önemi. Ed: Durmaz R. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu: 64-75, 3-7 Eylül 2007.
- 141-Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, bla_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. December; 53(12): 5046-5054, 2009.
- 142-Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, Sawai T. Functional Analysis of the Active Site of a Metallo- β -Lactamase Proliferating in Japan. Antimicrob. Agents Chemother; 44(9): 2304-2309, 2000.
- 143-Simon Dally, Karin Lemuth,, Martin Kaase, Steffen Rupp, Cornelius Knabbe, and Jan Weile. DNA Microarray for Genotyping Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother; 57(10): 4761–4768, 2013.
- 144-Dally S, Lemuth K, Kaase M, Rupp S, Knabbe C, Weile J. DNA Microarray for Genotyping Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother: 57(10): 4761–4768, 2013.
- 145- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother; 59(2): 321-322, 2007.
- 146-Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect; 16: 1614–19, 2010.

- 147-Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance in 1 to 2.5 hours, *J Clin Microbiol*; 49(9): 3321-4, 2011.
- 148- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *PLoS One*; 7(2): 31676, 2012.
- 149-Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 223-32, 1997.
- 150-Çiftçi İH, Aşık G, Karakeçe E, Öksüz L, Yağcı S et al. Distribution of bla_{OXA} genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study. *Microbiol Bul*; 47(4): 592-602, 2013.
- 151-Susnea I, Bernevic B, Wicke M, Ma Li, Liu S, Schellander K, Przybylski M et al. Application of MALDI-TOF-Mass Spectrometry to Proteome Analysis Using Stain-Free Gel Electrophoresis. *Top Curr Chem*; 331: 37-54, 2013.
- 152-CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
- 153-Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents*; 27: 351-353, 2006.
- 154-Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*; 67(4): 906-909, 2012.
- 155-Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the bla_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*; 16(1): 35-40, 2010.
- 156-Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*; 51: 79-84, 2010.
- 157- Gaur A, Prakash P, Anupurba S. Possible role of integrase gene polymerase chain reaction as an epidemiological marker: study of multidrug-resistant. *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial infections. *Int J Antimicrob Agents*; 29(4): 446-50, 2007.

- 158- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 5-22, 2004.
- 159-Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*; 54: 101-6, 2008.
- 160-Lye DC, Wijaya L, Chan J, Teng CP, Leo YS. Ertapenem for treatment of extended-spectrum beta lactamase-producing and multidrug resistant Gram-negative bacteremia. *Ann Acad Med Singapore*; 37: 831-4, 2008.
- 161-Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 424-427, 1999.
- 162-Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo- β -lactamase mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*; 41: 276-278, 2005.
- 163-Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesi ve diğer ünitelerde yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında invitro antibiyotik direnci. *Ankem Derg*; 19(3): 115-18, 2005.
- 164-Kurtoğlu MG, Opuş A, Kaya M, Keşli R. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibakteriyel direnç (2008-2010). *ANKEM Derg*; 25: 35-41, 2011.
- 165-Evren E, Göçmen JS, Demirbilek M, Alışkan HE. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarının İmipenem, Meropenem, Kolistin, Amikasin ve Fosfomisin Duyarlılıkları, *Gazi Medical Journal*; 24: 1-4, 2013.
- 166- Gacar G, Midilli K, Kolaylı F, Ergen K, Gündes S et al. Genetic and enzymatic properties of metallo beta lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 4400-3, 2005.
- 167-Aktaş Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1 producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect*; 12: 695-6, 2006.
- 168-Yıldırım I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli, C, Rossolini, G. First detection of VIM-1 type metallo beta lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical

isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta lactamase. Int J Antimicrob Agents; 29: 621, 2007.

169-Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58) producing *A. baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. J Med Microb; 57: 1529-32, 2008.

170-Siemann S, Brewer D, Clarke AJ, Dmitrienko GI, Lajoie G, Viswanatha T. et al. IMP-1 metallo beta lactamase: Effect of Chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. Biochim Biophys ACTA; 1571: 190-200, 2002.

171- Sesli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Arıdoğan B. Investigation of Metallo-Beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates with four different phenotypic methods. İnfeksiyon Dergisi; 23(2): 51-55, 2009.

172- Ulusoy-Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ, Karahan ZC, Baran I, Kurşun Ş. İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg; 41(1): 29-36, 2011.

173-Çıkman A, Berktaş M, Bektaş A, Özkaçmaz A, Yaman G. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. Van Tıp Dergisi; 18(3): 132-135, 2011.

174-Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Gülay Z, Arslan U, Nevgün SO. Metallobeta-Lactamase Enzymes and Antibiotic Susceptibilities in Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Intensive Care Units in Turkey. Türkiye Klinikleri J Med Sci; 32: 687-93, 2012.

175-Bulut Y, Çağlar H. Gram Negatif Non-fermantatif Bakterilerde Metallo-Beta Laktamaz Enziminin Farklı Yöntemlerle Gösterilmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi; 27(3): 135-140, 2013.

176- Altınöz-Aytar A, Şahin İ, Öztürk E, Öksüz Ş, Avcıoğlu F, Çalışkan E, Ankaralı H. Gram Negatif Nonfermantatif Bakterilerde Metallo-Beta-Laktamaz Aktivitesinin Çeşitli Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. ANKEM Derg; 29(1): 8-15, 2015.

177-Shin KS, Sona BR, Hong SB, Kim J Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 62: 102–105, 2008.

- 178-Şimşek M, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerine ait klinik izolatlarda metallo-beta-laktamaz yapımının farklı feenotip yöntemlerle incelenmesi, Türk Klinik Lab Derg; 1(1): 11-16, 2010.
- 179-Gibb A, Tribudharat C, Moore R, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with new bla_{IMP} allele, bla_{IMP-7} Antimicrob Agents Chemother; 46(1): 255-8, 2002.
- 180-Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? Lancet Infect Dis; 11: 381-93, 2011.
- 181-Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Petinaki E, Vatopoulos AC, Tzelepi E, Miriagou V et al. Characterization of metallo-beta-lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae* ST147. Antimicrob Agents Chemother; 55: 3570-2, 2011.
- 182- Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-beta-lactamase gene bla_{VIM} in a level I Iranian burn hospital. Burns; 36: 826-30, 2010.
- 183-Çakar A. Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinde ayrıştırılan *P. aeruginosa* izolatlarında metallo beta laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması, Hacettepe Üniversitesi sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2000.
- 184-Özgümüş OB, Caylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K, Köksal I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microb Drug Resist; 13: 191-8, 2007.
- 185-Aksoy MD. Karbapenemlere Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Metallo Beta Laktamaz Enzimlerinin Fenotipik Ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne, 2013.
- 186-Liu S, Wang Y, Xu J, Li Y, Guo J, Ke Y, Yuan X, Wang L, Du X, Wang Z, Huang L, Zhang N, Chen Z. Genome sequence of an OXA23- producing, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain of sequence type ST75. J Bacteriol; 194(21): 6000-1, 2012.

- 187-Olaitan AO, Berrazeg M, Fagade OE, Adelowo OO, Alli JA, Rolain JM. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase, Nigeria. *Int J Infect Dis*; 17(6): 469-70, 2013.
- 188-Azimi L, Talebi M, Pourshafie MR, Owlia P, Lari AR. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*;4:1,2015.
- 189- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of Clinical Microbiology*; 2974-2976, 2006.
- 190-Keskin H, Tekeli A, Dolapçı, Öcal D. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında Beta-Laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyol Bul*; 48(3): 365-376, 2014.
- 191-Taşbent-Esenkaya F, Özdemir M. *Pseudomonas* suşlarında OXA Tipi Karbapenemazların Varlığı: Türkiyeden İlk Bildirim. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 26-34.
- 192-Wang H, Guo P, Sun H, Wang, H, Yang O, Chen, M, Xu, Y and Zhu Y. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 10: 4022-4028, 2007
- 193-Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J Med Res*;122(11): 408-418, 2005.
- 194- Khoo CT, Tan TT, Arshad ABM, Ang LP, Lau LJ, Hsu LY, Ooi EE. Multilocus sequence Types of carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying Metallo-β-Lactamase Genes, including the novel bla_{IMP-26} Gene. *Journal of Clinical Microbiology*; 7: 2563-64, 2010.
- 195-Lucena A, Dalla-Costa LM, Nogueira KS, Matos AP, Gales AC, Paganini MV, Castro MES, Raboni SM. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *Journal of Hospital Infection*; 87: 234-240, 2014.
- 196-Ayan M, Durmaz R, Aktaş E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect*; 54: 39-45: 2003.

- 197-Gördebil S. Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında direnç genlerinin PCR ile araştırılması ve PFGE yöntemiyle genotip tayini. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2011.
- 198-Çekin Y, Karagöz A, Kızılateş F, Çekin AH, Öztoprak-Halıcı N, Bülbüller N, Durmaz R. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı bir hastane enfeksiyonu salgınının incelenmesi. Mikrobiyol Bul; 47(4): 619-627, 2013.
- 199-Yetkin G, Otlu B, Çiçek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic and epidemiologic charecteristic of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. American Journal of Infection Control; 5: 188-192, 2006.
- 200-Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: American Society for Microbiology; 563-72, 1993.
- 201-Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature J Hosp Infect; 64: 7-15, 2006.

7. ÖZGEÇMİŞ

1971’de Konya ilinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini aynı ilde çeşitli devlet okullarında tamamladı. 1993 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden mezun oldu. 1994 yılında YYÜ Sağlık Hizmetleri MYO Öğretim Görevlisi olarak başladığı görevine Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji-Toksikoloji doktorasını tamamladıktan sonra Dr. Öğretim Görevlisi olarak devam etti. Eylül-2011’de Tıpta uzmanlık sınavını kazandı. Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünden mazeretsiz yatay geçiş yaparak; YYÜ Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünde Temmuz 2013’te itibaren uzmanlık eğitimine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizce olup, evli ve iki çocuk annesidir.