

**T.C  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
SERVİS ŞEFLİĞİ**

**HASTANE KAYNAKLI GRAM NEGATİF NON FERMENTATİF  
BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİ, ANTİBİYOTİK DİRENÇ  
MEKANİZMALARI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GELİŞİMİNE NEDEN  
OLAN RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Utku KAVRUK  
J. TBP. YZB.**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
UZMANLIK DALI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL  
2007**



**T.C  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
SERVİS ŞEFLİĞİ**

**HASTANE KAYNAKLI GRAM NEGATİF NON FERMENTATİF  
BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİ, ANTİBİYOTİK DİRENÇ  
MEKANİZMALARI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GELİŞİMİNE NEDEN  
OLAN RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Utku KAVRUK**

J. Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı' nın  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Programı  
İçin Öngördüğü  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır.

**TEZ DANIŞMANI**

Oral ÖNCÜL

Doç. Tbp. Yb.

**İSTANBUL**

**2007**

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığı' na:

“Hastane kaynaklı gram negatif non fermentatif bakterilerde antibiyotik direnci, antibiyotik direnç mekanizmaları ve antibiyotik direnç gelişimine neden olan risk faktörlerinin belirlenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bilim Dalı' nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez danışmanı: Doç. Tbp. Yb. Oral ÖNCÜL

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Şaban ÇAVUŞLU .....

Üye : Prof. Hv. Tbp. Kd. Alb. Can Polat EYİGÜN .....

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Tunçer HAZNEDAROĞLU .....

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Yavuz HARMANYERİ .....

Üye : Doç. Tbp. Yb. Oral ÖNCÜL .....

J. Tbp. Yzb. Utku KAVRUK' un 18 Ekim 2007 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu' nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR  
Prof. Tbp. Tümgeneral  
Askeri Tıp Fakültesi Dekanı  
Eğitim Hastanesi Baştabibi

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Şaban ÇAVUŞLU ve Doç. Tbp. Yb. Oral ÖNCÜL ve Yrd. Doç .Hv. Tbp. Bnb. Vedat TURHAN' a minnet ve saygılarımı arz ederim.

Laboratuar uygulamalarında bilgi ve deneyimleri ile tarafıma gösterdikleri sonsuz hoşgörü, özveri ve yardımlarından dolayı Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Tunçer HAZNEDAROĞLU, Doç. Dr. Vet. Tbp. Kd. Alb Mustafa ÖZYURT, Uzm. Dr. Vet. Tbp. Kd. Alb Ali ERDEMOĞLU, Tbp. Yb. Nurittin ARDIÇ, Tbp. Atğm. Koray ERGÜNAY, Lab. Sv. Me. Mustafa TAMAY ve Lab. Sv. Me. Dilber ÖZEN' e şükranlarımı sunarım.

Tez konum ile ilgili olarak ülkemizde eşsiz çalışmalar yapan ve bu tecrübelerini daima benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Çiğdem BAL ve Uzm. Dr. Zerrin AKTAŞ' a teşekkürlerimi sunarım.

Dört yıllık uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman desteklerini gördüğüm asistan arkadaşlarıma, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi ile Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisinin tüm hemşire ve personeline saygılarımı sunarım.

Son olarak, bir Türk kadınına yakışır şekilde, on yıldır daima yanımda olan, beni destekleyen, özveri ile sıkıntılara göğüs geren eşim Serpil KAVRUK' a ve beni bu günlere getiren aileme karşı minnet duygularımı ifade etmek isterim.

Utku KAVRUK  
J. Tbp. Yzb  
İstanbul 2007

## ÖZET

### **Hastane Kaynaklı Gram Negatif Non Fermentatif Bakterilerde Antibiyotik Direnci, Antibiyotik Direnç Mekanizmaları Ve Antibiyotik Direnç Gelişimine Neden Olan Risk Faktörlerinin Belirlenmesi**

Gram negatif non fermentatif bakteriler (GNNFB) sağaltımı zor hastane infeksiyonlarına neden olan sorunlu bakterilerdir. Antibiyotiklerle karşılaşmaları durumunda hızlı direnç geliştirmeleri en önemli özelliklerindedir. Bu grup bakterilerden özellikle dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının hastane infeksiyon etkeni olarak izolasyon sıklığı son yıllarda artmıştır. Bu çalışmada hastanemizdeki gram negatif non fermentatif bakteri tehdidinin boyutunu ortaya koymak, bu bakterilerdeki antibiyotik direnç oranlarını saptamak, antibiyotik direnç gelişimine neden olan risk faktörlerini belirlemek ve metallo beta laktamazların varlığını araştırmak hedeflenmiştir. Bu çalışma Mart 2006-Mart 2007 tarihleri arasında hastanemizin yatan hasta servislerinde prospektif olarak yürütülmüş ve hastaların izlemi aktif sürveyans yöntemi ile yapılmıştır. Etkenlerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. IMP ve VIM grubu metallo beta laktamaz (MBL) genleri için tarama testi olarak EDTA temelli yöntemler, doğrulama testi olarak ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmıştır.

Çalışma süresince 8673 hasta izlenmiştir. 152 hastada 276 gram negatif non fermentatif infeksiyon atağı gözlenmiştir. GNNFB %34 oranında en sık hastane infeksiyonu etkeni olmuş ve bu olgularda mortalite yüksek bulunmuştur (%40,7). Suşların %40,1' i Yanık ve Anestezi Yoğun Bakım Servislerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Hastaların ortalama yaşı 55,3 yıl, santral katater kullanım oranı 0,22, ventilatör kullanım oranı 0,15, üriner katater kullanım oranı 0,4 olarak saptanmıştır.

Çoğul antibiyotik direnci *Pseudomonas* suşlarında %24,4, *Acinetobacter* suşlarında ise %66,4 olarak tespit edilmiştir. Çoğul antibiyotik direnç gelişimi açısından *Pseudomonas* suşlarında yoğun bakımda yatıyor olmak (OR: 0,21, CI%95 [0,06-0,66]) ve önceden karbapenem kullanımı (OR: =,28, CI%95 [0,1-0,72]), *Acinetobacter* suşlarında ise önceden karbapenem kullanımı (OR: 0,41, CI%95 [0,17-0,99]) bağımsız risk faktörleridir. Tarama testleri ile %24,2 oranında MBL pozitifliği saptanırken, PZR ile beş imipenem dirençli ve iki imipenem duyarlı *Pseudomonas* suşunda (%5,7) IMP grubu MBL gen varlığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak hastanemizde GNNFB hastanemizde ciddi bir sorundur. Çalışmamızda tanımlanan risk faktörlerinin kontrolü ile GNNFB' de antibiyotik direnç gelişimi engelleyecektir. Bunun yanı sıra olası direnç sorununun erken ortaya konması amacı ile tarama testleri ile MBL pozitif olarak saptanan izolatlarda mutlaka moleküler doğrulama testleri yapılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, çoğul direnç, risk faktörleri, metallo beta laktamaz, polimeraz zincir reaksiyonu.

**Yazar adı:** J. Tbp. Yzb. Utku KAVRUK

**Danışman:** Doç. Tbp. Yb. Oral ÖNCÜL

## SUMMARY

### **Investigation of Patterns and Mechanisms of Antibiotic Resistance and Risk factors Associated with Antibiotic Resistance in Gram Negative Non Fermentative Bacteria Isolated from Hospital Setting.**

Gram negative non fermentative bacteria (GNNFB) cause serious hospital infections and are hard to treat. *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. which can easily develop resistance to antibiotics, have been frequently isolated in hospital infections in recent years.

This study was planned to determine the threat of GNNFB in our hospital via detection of antibiotic resistance rates, risk factors associated with antibiotic resistance and metallo beta lactamase (MBL) activity.

The prospective study was carried out between March 2006 and March 2007 in in-patient services in our hospital and the patients were observed with active surveillance. Disk diffusion and microdilution tests were used to determine antibiotic susceptibilities. IMP and VIM type MBL' s were detected by EDTA based assays and further confirmed by polymerase chain reaction (PCR).

During the study, 8673 patients, 152 of whom developed 276 GNNFB associated hospital infections were observed. GNNFB were the most common cause of hospital infections (34%) and in those patients, the mortality rates were high (40,7%). The 40,1% of the organisms were isolated in burn and intensive care units (ICU's). Patient's mean age was 55,3, central venous catheter rate was 0,22, mechanical ventilation rate was 0,15 and urinary in-dwelling catheter rate was 0,4 in 1000 device days. Multi-drug resistance was 24,2% in *Pseudomonas* spp. and 66,4% in *Acinetobacter* spp. ICU admission (OR: 0,21, CI%95 [0,06-0,66]), previous carbapenem use (OR: =,28, CI%95 [0,1-0,72]) in *Pseudomonas* spp and previous carbapenem use (OR: 0,41, CI%95 [0,17-0,99]) in *Acinetobacter* spp. were assigned as independent risk factors for imipenem resistance. Using EDTA based assays MBL was detected 24,2% and only 5,7% of *Pseudomonas* spp of which five imipenem resistant and two imipenem susceptible were confirmed to be IMP type MBL positive.

As a conclusion, GNNFB are serious problems in our hospital and controlling the identified risk factors can minimize imipenem resistance. PCR confirmation should be performed in MBL suspicious isolates identified by EDTA based assays.

**Keywords:** *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, multi-drug resistance, , risk factors, metallo beta lactamase, polymerase chain reaction.

**Author** : J. Tbp. Yzb. Utku KAVRUK

**Counselor** : Doç. Tbp. Yb. Oral ÖNCÜL

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>ÖZET</b>	v
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	viii
<b>ŞEKİLLER</b>	ix
<b>TABLolar</b>	x
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Tanımlar	4
2.3. Gram Negatif Non Fermentatif Bakteriler	6
2.4. Beta Laktamazlar ve Kazanılmış Metallo Beta Laktamazların Önemi	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	28
3.1. Hastaların İzlemi	29
3.2. Laboratuarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler	30
3.3. Mikroorganizmaların Tanımlanması	32
3.4. Mikroorganizmaların Antibiyotik Direncinin Saptanması	32
3.5. Metallo Beta Laktamaz Tarama Testleri	36
3.6. Tarama Testi Olumlu Etkenlerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Metallo Beta Laktamaz Direnci Geni Varlığının Araştırılması	39
3.7. İstatistiksel Analizler	41
<b>4. BULGULAR</b>	42
<b>5. TARTIŞMA</b>	58
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	71
<b>7. KAYNAKLAR</b>	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR

GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GNNFB	: Gram negatif non fermentatif bakteriler
MBL	: Metallo beta laktamaz
DYB	: Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
NYB	: Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AYB	: Anestezi Yoğun Bakım Servisi
GCYB	: Genel Cerrahi Yoğun Bakım Servisi
BCYB	: Beyin Cerrahi Yoğun Bakım Servisi
KDCYB	: Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım
CAİ	: Cerrahi alan infeksiyonu
ÜSi	: üriner sistem infeksiyonu
KDi	: Kan dolaşım infeksiyonu
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
VİP	: Ventilatör ilişkili pnömoni
İMP:	: İmipenem
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
CDC	: Center for Disease Control
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
AZT	: Aztreonam
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri

## ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Hastane infeksiyon etkenlerinin kronolojik dağılımı.	4
Şekil 2.2. GNNFB' in tanımlama algoritması	9
Şekil 2.3. Şekil 2.2' de tanımlanamayan GNNFB tanımlama algoritması	10
Şekil 2.4. Tanımlanan plazmid kaynaklı metallo-beta-laktamaz genlerinin dünya üzerinde dağılımı.	27
Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması.	28
Şekil 3.2. Hasta takip algoritması.	30
Şekil 3.3. 8x12 boyutundaki plakta antibiyotik dilüsyonları, pozitif - negatif kontroller ve bakterilerin yerleşimi.	35
Şekil 3.4. İmipinem duyarlı bir <i>P. auriginosa</i> ' da E-test ile izlenen MİK değeri (0,5 µg/ml).	36
Şekil 3.5: İmipeneme duyarlı izolatlarda MBL tarama testi.	38
Şekil 3.6. İmipeneme dirençli izolatlarda MBL tarama testi.	39
Şekil 4.1. Etkenlerin servislere göre dağılımı.	44
Şekil 4.2. Etkenlerin neden olduğu hastane infeksiyonları ve dağılımı	44
Şekil 4.3. <i>Acinetobacter</i> spp. yoğunluğu ve diğer parametrelerin mevsimsel değişimi.	46
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas</i> infeksiyonlarında tedavide tercih edilen antibiyotiklerin dağılımı.	52
Şekil 4.5. <i>Acinetobacter</i> infeksiyonlarında tedavide tercih edilen antibiyotiklerin dağılımı	53
Şekil 4.6. MBL pozitif izolatların jel elektroforez sonrası ultraviyole ışık altında görünüşleri.	55

## TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. GNNFB' in sınıflaması ve hastane infeksiyon etkeni olan türleri	7
Tablo 2.2. <i>Pseudomonas</i> türlerinin farklı çalışmalardaki antibiyotik direnç oranları.	12
Tablo 2.3. <i>Pseudomonas</i> türlerindeki antibiyotik grubuna göre direnç mekanizmaları	14
Tablo 2.4. <i>Pseudomonas</i> türlerinde antibiyotiğe göre kullanılan direnç mekanizmaları.	15
Tablo 2.5. <i>Acinetobacter</i> türlerinin farklı çalışmalardaki antibiyotik direnç oranları.	19
Tablo 2.6. Beta laktamaz sınıflama şemaları.	24
Tablo 3.1. Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri.	29
Tablo 4.1. Hastaların sörveyans sonuçları (S=152).	43
Tablo 4.2. Önceden antibiyotik kullanım oranları.	45
Tablo 4.3. <i>Pseudomonas</i> türlerinin servislere göre direnç durumu	47
Tablo 4.4. <i>Acinetobacter</i> türlerinin servislere göre direnç dağılımı	48
Tablo 4.5. İmipeneme dirençli etkenlerle infeksiyon gelişimi açısından risk faktörleri.	49-50
Tablo 4.6. <i>Pseudomonas</i> ve <i>Acinetobacter</i> suşlarında imipenem için disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerinin sonuçları.	50
Tablo 4.7. Etkenlerde imipeneme direnç gelişimi açısından risk faktör analizi.	54-55
Tablo 4.7. Metallo beta laktamaz geni taşıyan izolatların epidemiyolojik ve klinik özellikleri.	57

## 1. GİRİŞ:

Hastane enfeksiyonları ciddi bir mortalite ve morbidite nedenidir. Tıp bilimindeki gelişmeler tanı ve tedavi olanaklarını (örneğin immünsüpresifler ve antineoplastikler) ve yoğun bakımda yatarak takip edilen immün sistemi baskılanmış hasta sayısını ciddi oranda arttırmıştır. Yoğun bakımda takip edilen hastalara uygulanan invaziv girişimler ve cerrahi müdahaleler sonrası hastalar daha kolay enfekte olmuş ve hastane enfeksiyonları çok daha ciddi bir sorun haline almıştır.

Hastane enfeksiyonu etkeni olarak en sık izole edilen patojenler arasında gram pozitif bakterilerden stafilokok ve enterokok türleri ile gram negatif bakterilerden *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* cinsleri ve non fermentatif bakteriler sayılabilir. Bunlar arasında özellikle antibiyotiklere dirençli suşların sebep olduğu enfeksiyonlar ciddi mortalite ve morbidite artışına yol açmaktadır. Özellikle son 20 yılda antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç ve hastanede nemli ortamlarda kolonize olabilen gram negatif non fermentatif bakteriler (GNNFB)' e bağlı hastane enfeksiyonları giderek artan oranda görülmektedir. Birçok çalışmada GNNFB' in hastanelerde epidemi yapma potansiyelleri olduğu da vurgulanmıştır (1-4).

Hastanemizin önceki yıllara ait verileri incelendiğinde, 1999 Marmara Depremi öncesinde hastanemizde GNNFB nadiren soyutlanırken deprem döneminde yatan hastaların %31,2' sinde *Acinetobacter* suşları hastane enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir (5). 2001 yılında yatan hastalardan izole edilen tüm GNNFB' in diğer bakterilere oranı %22 iken, 2006 yılında 6 aylık dönemde bu oran %37' ye ulaşmıştır (6).

Gram negatif non fermentatif bakterilerin birçok antibiyotiğe karşı dirençli olmaları nedeni ile etken oldukları enfeksiyonlarda tedavi alternatifleri son derece sınırlıdır. Son yıllarda GNNFB' de giderek artan karbapenem direnci, tedavide son seçenek olan karbapenem grubu (imipenem ve meropenem) antibiyotiklerin hızla kaybedilmesine yol açmaktadır. Bu nedenle elimizdeki antibiyotiklerin korunması ve kaybedilenlerin yeniden kazanılması büyük önem taşımaktadır. 2003 yılında hastanemizde yatan hastalardan izole edilen GNNFB' de

karbapenem (meropenem) direnci % 26 iken, 2004 yılında bu oran % 51'e çıkmıştır. Direnç oranındaki artış yaklaşık iki kat olarak izlenmiştir. Karbapeneme dirençli GNNFB' in yol açtıkları enfeksiyonlarda tedavide kullanılacak antibiyotiklerin sınırlı olması/yokluğu mortalite ve morbiditeyi arttırıcı bir etkiye sahiptir. Enfeksiyon kontrol önlemleri ciddi mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olan bu bakterilerin eradikasyonunda önemli bir yer tutmaktadır. Evrensel kontrol önlemlerinin yanı sıra antibiyotik kullanımının kontrol altına alınması direnç gelişiminin azaltılmasına katkı sağlamaktadır. Bu nedenle her hastanenin kendi bakteri florasını ve bu bakterilerin antibiyotik direnç profilini ortaya koymasının yanında akılcı antibiyotik kullanım politikalarını uygulaması direnç gelişimi ile mücadelede ciddi katkı saylayacaktır.

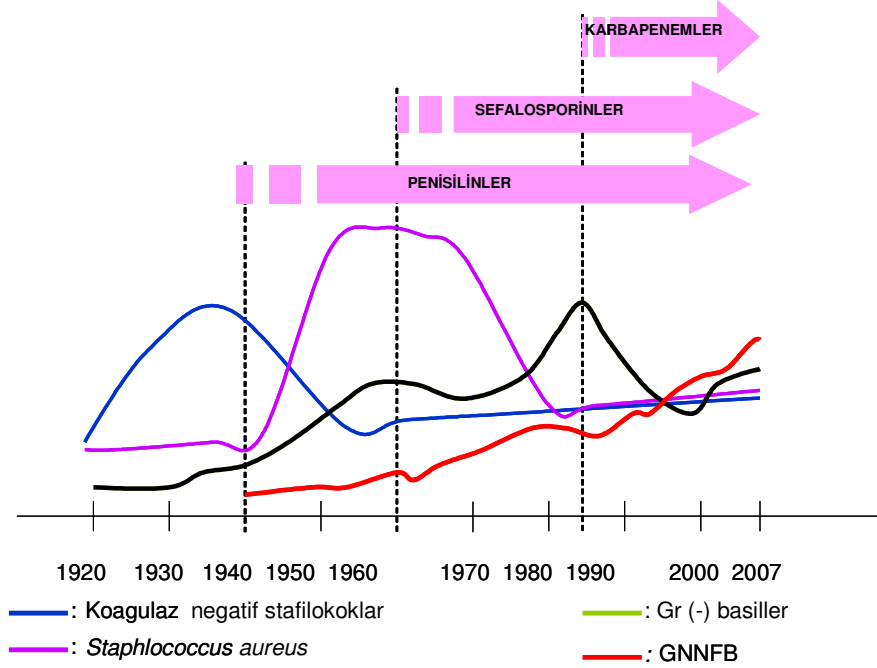
Yukarıda sunulan bilgilerin ışığında bu tez çalışmasında; a) hastanemizdeki GNNFB tehdidinin boyutunu ortaya koymak, b) bu bakterilerdeki antibakteriyel direnç oranlarını saptamak, c) direnç artışına neden olan risk faktörlerini belirlemek ve d) bakteriler arasında aktarılabilir bir direnç mekanizması olan metallo beta-laktamaz genlerinin varlığını ortaya koyabilmek amacıyla planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER:

### 2.1. Tarihçe:

Antibiyotikler öncesi dönem olarak adlandırılan 1920' li yıllarda, hastane enfeksiyonlarında streptokok türlerinin yoğun izolasyonu ile karşılaşılırken, 1940' lı yıllardan itibaren antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesi sonucunda tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi, hastane enfeksiyonları ile ilgili mücadelenin de kazanıldığı sanılmıştır. Söz konusu yıllarda daha gelişme sürecinde olan asepsi ve antisepsi uygulamaları antibakteriyel tedavilere karşı oluşan aşırı güven nedeniyle bir miktar sekteye uğramıştır. Ayrıca o yıllarda GNNFB nadiren izole edilen fırsatçı patojenler olarak değerlendirilmiş ve pek fazla önemsenmemişlerdir. Penisilinlerin klinik kullanıma girmesinden kısa süre sonra penisilinlere dirençli stafilokoklar, metisilin klinik kullanıma girmesinden sonra da metisiline dirençli stafilokoklar bildirilmeye başlanmış ve 1950-1960 yılları arasında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* salgınları izlenmiştir (7). Yeni tedavi arayışları 1960' lı yıllarda sefalosporinleri gündeme getirmiştir. Sefalosporinlerin yoğun klinik kullanımı ve zaman içerisinde yeni moleküllerle arttırılan gram negatif etkinlikleri özellikle 1970' lardan 1990' lara kadar beta-laktamlara dirençli gram negatif çomakların hastane enfeksiyonu etkeni olarak izolasyon oranlarında artışa yol açmıştır (8). Bu dönemlerde moleküler tekniklerin de yardımı ile gram negatiflerde birçok antibiyotik direnç mekanizması tanımlanmış ve bakterilerin direnç genlerini aktarabildikleri ortaya konmuştur (örneğin genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar). Gram negatif bakterilerdeki özellikle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) direnci nedeni ile 1985 yılından itibaren karbapenemler klinik kullanıma girmiştir. Ancak 1990' lı yıllarda antibiyotiklere çok kolay direnç geliştirdikleri bilinen GNNFB' de ilk metallo beta laktamaz varyantları olan enzimler saptanmaya başlamıştır (9). Çoklu dirençli GNNFB 2000' li yıllara gelindiğinde giderek daha fazla önem kazanmışlardır (10) (Şekil 2.1). Direnç durumunda yıllar içerisinde gözlenen bu artış, GNNFB' in daha sık hastane enfeksiyonu etkeni olarak

izole edilmelerini de beraberinde getirmiştir. Günümüzde hastane enfeksiyonları epidemiyolojisinde çoklu dirençli GNNFB' ler en önemli yeri almaktadır.



Şekil 2.1. Hastane enfeksiyonu etkenlerinin kronolojik dağılımı.  
(Hospital Infections, Bennet, 1998' den uyarlanmıştır)

## 2.2. Tanımlar:

### 2.2.1. Hastane Enfeksiyonu:

Yunanca' daki nosos (hastalık) ve komeion (ilgilenmek) kelimelerinden “nosocomial” kelimesi ortaya çıkmıştır. Hastaneye kabul esnasında inkübasyon periyodunda olmayan ve hastanın hastaneye yattığı süre içinde veya hastaneye yatışın bir sonucu olarak ortaya çıkan herhangi bir enfeksiyon bu kapsamda değerlendirilir (11). Hastane enfeksiyonları, genellikle hasta hastaneye yattıktan 48–72 saat sonra ve taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişir. Ancak Lejyonella ve suçiçeği gibi inkübasyon süresi uzun hastalıklarda enfeksiyon gelişim süresi ayrıca değerlendirilir. Cerrahi girişim sonrası 30 gün içinde ortaya çıkan cerrahi alan

enfeksiyonları ve bir yıl içinde ortaya çıkan protez enfeksiyonları da hastane enfeksiyonu kapsamında değerlendirilir (12).

### **2.2.2. Sağlık Hizmetleri ile İlişkili Enfeksiyon:**

Son yıllarda yurtdışında özellikle kronik hastalıklarda tedavi işlemlerinin hastane dışında yapılması ve hastaların hastaneden en kısa sürede taburcu edilmesi ile hastane enfeksiyonu tanımının yetersiz kaldığı durumlar ortaya çıkmıştır (örneğin evde tedavi uygulamaları sonrası gelişen katater enfeksiyonları veya ayaktan hastaya yapılan sistoskopi sonrası bakteriyemi). Bu enfeksiyonlar hastane ortamı dışında gelişmelerine karşın, etken olan patojenlerin hastane kaynaklı olması tanımlama konusunda bazı güçlükleri ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle “Sağlık Hizmetleri ile İlişkili Enfeksiyon” (*Health-care associated infection*) tanımı ortaya atılmıştır.

Sağlık hizmeti verilen herhangi bir yerde (örneğin acil servis, yoğun bakım, dializ merkezi, cerrahi merkez, bakımevi veya ev) alınan sağlık hizmeti ile ilişkili olmak üzere (örneğin sağlık hizmeti alınırken inkübasyon periyodunda veya aktif olmayan enfeksiyonlar) hastada ortaya çıkan enfeksiyonu tanımlar (11).

### **2.2.3. Çoklu Dirençli Mikroorganizma:**

“Çoklu dirençli mikroorganizma” (*Multi-drug resistant, MDR*) tanımında halen uzlaşmaya varılmış değildir. Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control= CDC) tarafından yapılan tanımda bir veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli mikroorganizmaların çoklu dirençli olarak adlandırılabileceği ifade edilmektedir. Ancak yine aynı rehberde vankomisine dirençli enterokok, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi olan veya çok sayıda antibiyotik sınıfına dirençli gram negatiflerin özel bir yere sahip olduğu belirtilmiştir (11).

Bu çalışmada; CDC tanımlamasına paralel olarak Jones ve ark. (13) tarafından önerilen imipeneme dirençli bütün izolatlar çoklu dirençli mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir.

#### **2.2.4 Önceden Antibiyotik Kullanımı**

Olguların hastaneye yatışından sonra, enfeksiyon gelişiminden önce başlanan ve 48 saat ve daha uzun süreli kullanılan antibiyotikler “önceden antibiyotik kullanımı” olarak değerlendirilmiştir.

### **2.3. Gram Negatif Non Fermentatif Bakteriler:**

Gram negatif non fermentatif bakteriler doğada toprakta ve nemli ortamlarda yaygın olarak bulunan, gram negatif boyanma özelliğinde olan ve son yıllarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak giderek artan sıklıkta izole edilen bakterilerdir. GNNFB başlıca 15 aile altında sınıflandırılabilir Bu aileler içerisindeki cinslerden en önemli hastane enfeksiyon etkenleri ise *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* ve *Stenotrophomonas* cinslerine ait türler sayılabilir (Tablo 2.1). Sağlıklı bireylerde nadiren enfeksiyona yol açarken, immünitesi baskılanmış (örneğin diyabet ve immünsüpresif ajan kullanımı), yoğun bakımda yatan, invaziv aygıt uygulanan (örneğin mekanik ventilasyon) ve ciddi komorbiditesi (örneğin kistik fibrozis) olan hastalarda tedavisi son derece güç enfeksiyonlara yol açar.

Tablo 2.1. GNNFB' in sınıflamasý ve hastane enfeksiyonu etkeni olan türleri (14).

Aile	Cins sayısı	Alt tür sayısı	Klinik önemli türler	Hastane enfeksiyonu	İzolasyon tarihi*
<i>Alcaligenaceae</i>	5	16	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KDE, ÜSE	1991
<i>Alteromonadaceae</i>	2	23	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella algea</i>	Dekübit, Osteomyelit, KDE	1972
<i>Brucellaceae</i>	1	2	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	BOS katater sepsis	1994
<i>Burkholderiaceae</i>	5	31	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	VİP, KDE, ÜSE	
<i>Caulobacteraceae</i>	1	2	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Brevundimonas diminuta</i>	KDE	1974
<i>Comamondaceae</i>	2	7	<i>Delftia acidovarans</i>	KDE, ÜSE	1994
<i>Flavobacteriaceae</i>	6	50	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	ACİ, KDE, Menenjit	1976
<i>Methylobactriaceae</i>	2	19	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Katater enfeksiyonu	2000
<i>Moraxellaceae</i>	3	24	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Moraxella nonliquefaciens</i>	Çeşitli	<1960
<i>Oceanospirillaceae,</i>	1	1	<i>Balneatrix alpica</i>	Yok	1987
<i>Pseudomonadaceae</i>	1	9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çeşitli	< 1960
<i>Rhizobiaceae</i>	1	1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	KDE, ÜSE, Peritonit	1989
<i>Sphingobacteriaceae</i>	1	7	<i>Sphigobacterium multivorum</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i> <i>Sphingobacterium thalophilum</i>	Peritonit KDİ Yara ÜSİ	1980
<i>Sphingomonadaceae</i>	1	23	<i>Sphingomonas puacimobilis</i>	KDE	1990
<i>Xanthomonadaceae</i>	1	5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Çeşitli	1986

ÜSE: Üriner sistem enfeksiyonu, KDE: Kan dolaşım yolu enfeksiyonu, BOS: Beyin omurilik sıvısı, VİP: Ventilator ilişkili pnömoni, ACE: Akciğer enfeksiyonu

\*: Hastane enfeksiyonu olarak ilk izole edilmiş tarihi

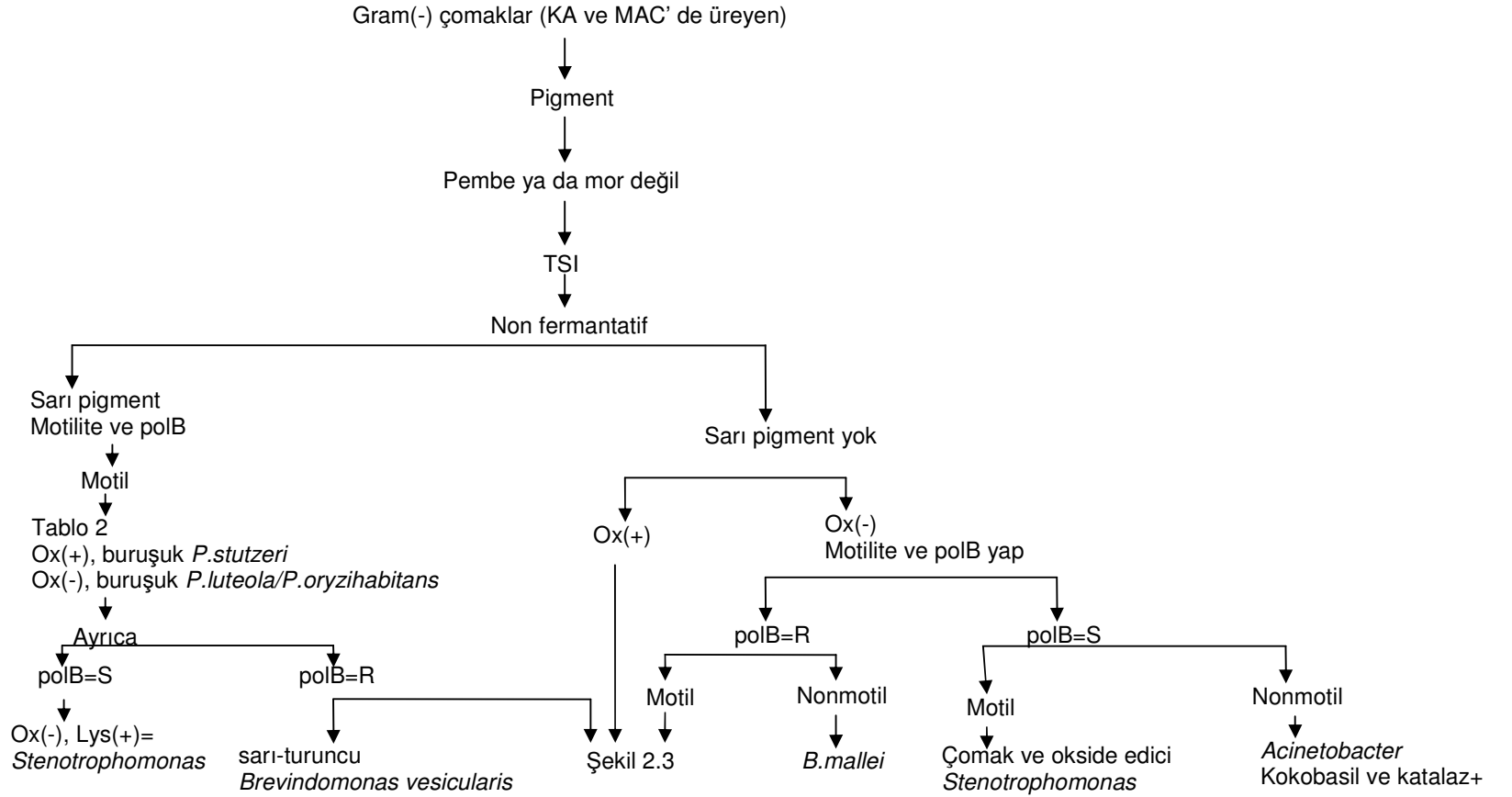
Gram negatif non fermentatif Bakteriler' in ortak biyokimyasal özelliği, enerji kaynağı olarak karbohidratları kullanmamaları veya fermentasyon dışındaki metabolik yollarla karbohidratları yıkmalarıdır. Yirmidört saatte

Kligler demir agar (KIA) veya üç şekerli agar (triple sugar iron [TSI] agar) yüzeyinde üreyebilmeleri, buna karşın dibinde ürememeleri ve asit oluşturmamaları GNNFB' in ayırt edici özelliklerindedir (14).

Laboratuarda izole edilen bir bakterinin non fermentatif olabileceğinin ilk bulguları, glikoz fermentasyonu yapmaması (TSI agar ve Krigler iron agar' da dipte ve eğik kısımda kırmızı [alkali] renk), sitokrom oksidaz enziminin varlığının saptanması ve McConkey agarda zor üremesidir. Ancak TSI agar ve KIA' daki yalancı pozitifliklerin önüne geçilmesi için Hugh- Leifson' un OF besiyeri kullanılabilir (14).

GNNFB' in *Enterobacteriaceae* ailesinden en önemli farkı sitokrom oksidaz testi pozitifliğidir. Ancak bazı GNNFB sitokrom oksidaz testinde negatif olarak izlenebilir. Bunlar arasında klinik öneme sahip olanlar *Stenotrophomonas* ve *Acinetobacter* türleridir (14).

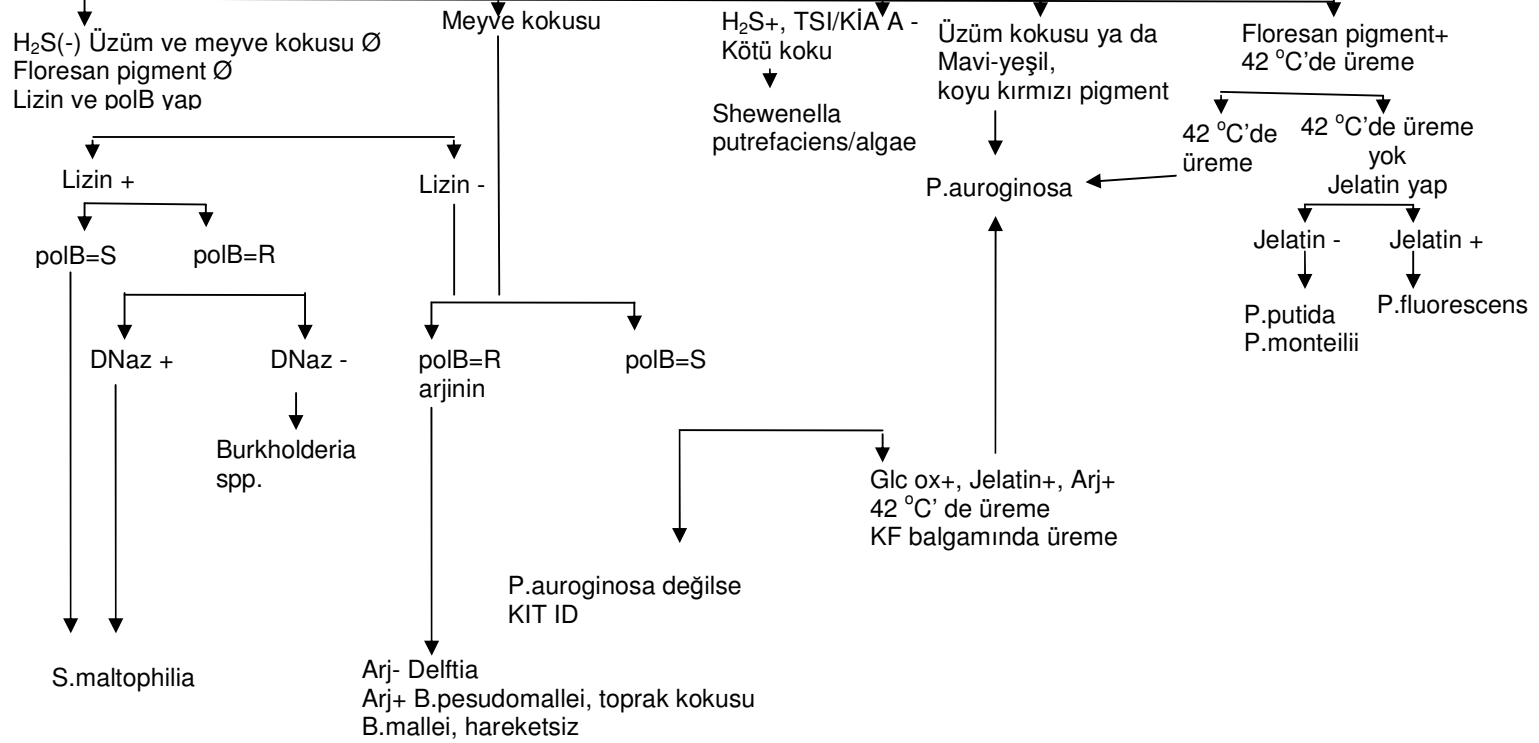
Klinik öneme sahip GNNFB' in tanımlanması şekil 2.2 ve 2.3' deki akış şeması izlenerek yapılmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamalarında konvansiyonel testler ile GNNFB' in tanımlanmasında yaşanan zorlukların önüne geçmek üzere otomatize ve yarı otomatize sistemler geliştirilmiş ve tüm dünyada yaygın olarak kullanıma sunulmuştur. Otomatize ve yarı otomatize sistemlerin güvenilirliğinin %90' nın üzerinde olduğu bildirilmiştir (15).



KA: Kanlı agar, MAC: Mac Conkey agar. Ox: Oksidaz, Lys: Lizin, polB: polimiksinB

Şekil 2.2. GNNFB' in tanımlama algoritması (16).

**Meyve kokusu ve H<sub>2</sub>S yapmayan, floresan pigment+ ve Şekil 2.1 ile ayırt edilemeyen non fermentatif gram - basiller**



PolB: Polimiksin B, R: Dirençli, S: Duyarlı, Glc: Glikoz, Ox: Oksidasyon, Arj: Arjinin, DNaz: DNA yıkan enzim, Ø: Yok

Şekil 2.3. Şekil 2.2' de tanımlanamayan GNNFB tanımlama algoritması (16).

### 2.3.1 ***Pseudomonas* Türleri:**

*Pseudomonas* cinsini oluşturan türler hastanelerde nemli ortamlarda kolonize olurlar. İnvaziv aygıtları (özellikle nebülizatör ve ventilatörleri), tıbbi solüsyonları ve pansuman setlerini kontamine eder ve dezenfektanlara direnç kazanabilirler (17). Sağlıklı dokularda nadiren enfeksiyon yaparken savunma mekanizmaları zayıfladığında hemen her dokuda enfeksiyona yol açabilirler (18).

#### **Epidemiyolojik ve klinik özellikleri:**

*Pseudomonas* cinsine ait türler arasında *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) immün yetmezlikli, debil ve kistik fibrozis hastalarında başta gelen hastane enfeksiyonu etkenidir (19). Ventilatörle ilişkili pnömonilerin ve kistik fibrozis hastalarındaki akciğer enfeksiyonunun başta gelen nedenidir (20, 21). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da bu bakteri yoğun bakım enfeksiyonlarında ilk sıralarda yer almaktadır (22, 23). Kemoterapi alan kanser hastalarında bakteriyeminin sık nedenlerindedir (24). *P. aeruginosa*'ya bağlı bakteriyemi ve sepsis, aynı zamanda AIDS, diabetes mellitus veya ciddi yanıklar gibi immun baskılanmaya yol açan durumlarda da görülebilir (25-27). *P. aeruginosa* hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının en sık üçüncü nedenidir ve genellikle invaziv aygıt uygulamaları veya cerrahi sonrası sekonder olarak gelişir (28, 29). *P. aeruginosa* hastanede yatan hastalarda nadiren göz, merkezi sinir sistemi, kardiak, eklem-kemik ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına da neden olabilir (18). Hastanemizde 2005 yılında izole edilen mikroorganizmaların % 15,9' unu *Pseudomonas* türleri oluşturmuştur.

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinde ülkemizdeki karbapenem direnç oranları %27-%52 arasında bildirilmektedir (30-33). Amerika Birleşik Devletleri'nde ise karbapenem direnci %12,3-%19,1 arasında değişmektedir (34). Avrupa' da yapılan çalışmalarda ise bu oran %11-%29 arasında bildirilmiştir (35, 36) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin farklı çalışmalardaki antibiyotik direnç oranları (%).

Çalışan	Yıl	Ülke	CAZ	IMP	AG	Kinolon
Akçam ve ark.(33)	2006	Türkiye	42,1	52,6	55,3	76,3
Fidan ve ark.(37)	2005	Türkiye	23	15	18	15
Yetkin ve ark.(32)	2006	Türkiye	33	29	11	34
Zarakoluve ark(30)	2006	Türkiye	52	51	65	45
Bayram ve ark.(38)	2006	Türkiye	71,3	26,1	48,4	59,2
Rhomberg ve ark(39)	2003	ABD	16	15	15	31
Turner ve ark(40)	2005	Avrupa	31	29	49	40
Pascual ve ark(35)	2003	ABD	19	11	28	24
Ardıç ve ark.(41)	2003	Türkiye	40	29	43	40

ABD: Amerika Birleşik Devletleri, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, AG: Aminoglikozit

### Direnç mekanizmaları:

#### Permeabilite değişikliği

*Pseudomonas aeruginosa* azalmış dış membran geçirgenliği, çeşitli eflüks pompa sistemlerinin sentezi ve antibiyotik inaktive edici enzimler (örneğin sefalosporinazlar) salgılaması nedeni ile intrinsik olarak birçok antibiyotiğe dirençlidir. Ayrıca yeni direnç mekanizması geliştirme veya diğer bakterilerden direnç mekanizmalarını kazanabilme potansiyeline sahiptir (42).

*Pseudomonas* suşlarında direnç mekanizmaları sıklıkla bir arada bulunur ve çoklu anibiyotik direncine neden olur. Örneğin "OprD porin" isimli molekül imipenem ve bir dereceye kadar da meropenem gibi hidrofilik karbapenemlerin hücre içine alımından sorumludur. Bu molekülün kantitatif veya kalitatif değişimleri azalmış membran geçirgenliğine neden olurken eflüks pompa sisteminin artmış aktivitesi ile de ilişkilidir. Bunun sonucu olarak birçok antibiyotik sınıfına birden direnç gelişir. Tek bir antibiyotiğe maruz kalma artmış pompa fonksiyonuna sahip

mutantların seleksiyonuna yol açarak pompanın substratı olan bütün antibiyotiklere karşı çapraz dirence yol açar. Örneğin bütün Mex eflüks pompalarının substratı olan kinolonlar aminoglikozitlere ve  $\beta$ -laktamlara da direnci körükler (43).

Önemli olarak OprD porin ve MexEF-OprN pompası zıt yönde etki gösteren düzenleyicilerin kontrolündedir. MexEF-OprN pompasının artmış sentezi pompayı kullanmayan ancak hücre içine girmek için porin molekülüne ihtiyaç duyan antibiyotiklere de direnç gelişimine neden olur (azalmış porin sentezi sonucu) (44). Eflüks genelde antibiyotiğe karşı düşük veya orta düzey dirençten sorumludur (45).

### **Antibiyotikleri inaktive eden enzimler**

Antibiyotiklerin enzimatik yıkımı  $\beta$ -laktam ve aminoglikozit grubu antibiyotikler için tanımlanmıştır. Son yıllarda  $\beta$ -laktamazlardan genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (GSBL) ve karbapenemazlar (metallo  $\beta$ -laktamazlar) giderek yaygınlaşmaktadır. GSBL' in karbapenemler dışında bütün  $\beta$ -laktamlara dirençten sorumlu olduğuna inanılırken, son yıllarda ortaya konan bazı GSBL enzimlerinin (örn. GES-2) karbapenemleri de hidrolize edebildiği gösterilmiştir (46). GSBL' in bir diğer tipi olan PER-1 enzimi ise sadece Güneydoğu Asya ve ülkemizden bildirilen diğer bir enzimdir (47, 48).

Karbapenemleri hidrolize eden metallo  $\beta$ -laktamazlar ise monobaktamlar hariç bütün  $\beta$ -laktam antibiyotikleri yıkar. Sıklıkla Asya' dan bildirilmelerine karşın son yıllarda Avrupa' da da salgınlara yol açmışlardır. Metallo beta laktamazlar, IMP, VIM, SIM, SPM ve GIM olmak üzere 5 ana grupta adlandırılırlar. IMP serisinden toplam 22 adet VIM serisinden ise toplam 13 adet alt enzim grubu tanımlanmıştır. Diğer gruplarda ise sadece bir enzim alt grubu vardır. Özellikle IMP ve VIM serisinden olan enzimler başka direnç genlerinin de bulunduğu integronlarda yer alır (örn. aminoglikozit yıkan enzimler) (49, 50). *Pseudomonas* türlerinin antibiyotik direncinde kullandığı mekanizmalar Tablo 2.2 ve 2.3' de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. *Pseudomonas* türlerindeki antibiyotik grubuna göre direnç mekanizmaları (18).

Antibiyotikler	Direnç mekanizmaları							Antibiyotik inaktive eden enzimler							Hedef modifikasyonu			
	Permeabilite değişikliği							β-laktamazlar				Aminoglikozit modifiye edici enzimler			Topoizomera z mutasyonu	Ribozom un metilasyonu		
	Aktif efflux							Sefalosporin aşırı üretimi	Daralmış spektrumlu penisilinazlar	Genişlemiş spektrumlu oksasilinazlar	Genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar	Metallo β-laktamazlar	AAC (3)-I	AAC(3)-II			AAC(6)-I	AAC(6)-II
OprD kaybı	MexAB	MexCD	MexEF	MexXY	MexGH	MexVW	Sefalosporin aşırı üretimi								Daralmış spektrumlu penisilinazlar	Genişlemiş spektrumlu oksasilinazlar		
β_laktamlar																		
Penisilinler		■	(■)		(■)			■	■	■	■	■						
Sefalosporinler		■			■			■	(■)	(■)	■	■						
Aztreonam		■	■					■	(■)	■	■							
Imipenem	■											■						
Meropenem	(■)	■										■						
Aminoglikozitler					■								GEN	GEN		GEN	GEN	■
														NET	NET	NET		
														TOB	TOB	TOB	TOB	
															AK			
Florokinolonlar	■	■	■	■	■	■	■											■

■ : Var, (■) : Nadiren var, GEN : Gentamisin için, NET : Netilmisin için, TOB : Tobramisin için, AK : Amikasin için

Tablo 2.4. *Pseudomonas* türlerinde antibiyotiğe göre kullanılan direnç mekanizmaları (18).

Antibiyotikler	Direnç mekanizmaları																
	Permeabilite değişikliği					Antibiyotik inaktive eden enzimler						Hedef modifikasyonu					
	Aktif efflux					β-laktamazlar					Aminoglikozit modifiye edici enzimler					Topoizomeras mutasyonu	Ribozomun metilasyonu
OprD kaybı	MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	MexXY-OprM	Sefalosporinaz aşırı üretimi	Daralmış spektrumlu penicilinazlar	Genişlemiş spektrumlu oksasilinazlar	Genişlemiş spektrum β-laktamazlar	metallo β-laktamazlar	AAC (3)-I	AAC(3)-II	AAC(6)-I	AAC(6)-II	ANT(2)-I			
Tikarsilin	S	I/R	S	S	S	I/R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Tikarsilin-klavulanat	S	I/R	S	S	S	I/R	I/R	R	I/R	R	S	S	S	S	S	S	S
Piperasilin	S	S	S	S	S	I/R	R	R	R	I/R	S	S	S	S	S	S	S
Piperasilin-tazobktam	S	S	S	S	S	I/R	I/R	R	I/R	I/R	S	S	S	S	S	S	S
Sefoperazon	S	I/R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Sefataksim	S	I/R	S	S	S	R	I/R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Seftazidim	S	S	S	S	S	I/R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Sefepim	S	S	I	S	I	S/I	S	I/R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Aztroenam	S	I/R	S	S	S	I/R	I	S/I/R	R	S/I	S	S	S	S	S	S	S
İmipenem	I/R	S	S	I*	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S/I/R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Gentamisin	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	S	R	R	S/I	R	R	S	R
Tobramisin	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
Amikasin	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Siprofloksasin	S	S/I	S/I	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

S: Duyarlı, R: Dirençli, I: Orta duyarlı

### **Hedef modifikasyonları**

Hedef modifikasyonları florokinolon direncinde detaylı olarak tanımlanmış direnç mekanizmasıdır. Florokinolonların hedef bölgeye (topoizomeraz IV ve DNA giraz) afiniteleri farklıdır. *P. aeruginosa'* da hedef bölge DNA girazdır ve organizma burada mutasyon yaparak direnç geliştirir (51). Mutasyon gelişen izolatlarda siprofloksasinin inhibitör potansi 16 kat azalmaktadır. Diğer kinolonlarda da benzer durum söz konusudur ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri duyarlılık sınırının üstünde saptanır. Aminoglikozit direncinde de hedef modifikasyonu (16S rRNA metilasyonu) gösterilmiştir.

### **Tedavi yaklaşımları:**

Ventilatöre bağlı hastalarda ve nötropenik hastalarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavi rehberleri Amerikan Toraks Topluluğu ve Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Topluluğu tarafından yayımlanmıştır (52). Bu rehberler diğer enfeksiyonlara da uygulanabilir. *P. aeruginosa'* nın neden olduğu hastane enfeksiyonlarında kısa sürede antibiyotik duyarlılık profilinin ortaya konması ve mikrobiyolojik örnekler alınır alınmaz merkeze ait duyarlılık profili göz önünde bulundurularak uygun tedavinin başlanması gereklidir. Erken başlanan tedavinin olumlu sonuçlarla ilişkisi vardır (53). Çoklu antibiyotik direncinin hızla yaygınlaşması nedeni ile ampirik tedavi uygulamasına asla güvenilmemeli mikrobiyolojik veriler elde edilir edilmez tedavinin gözden geçirilmesi gereklidir (18). Bu sayede tedavi esnasında dirençli suşların seleksiyonunun önüne geçilebilir. Başlangıçtaki tedavi seçiminde hastanın risk faktörleri ve merkezin epidemiyolojik verileri göz önünde bulundurulmalıdır. Tedavi protokolü bir anti-pseudomonal  $\beta$ -laktam (örneğin penisilinler, sefalosporinler veya karbapenemler) ile kombine edilmiş aminoglikozit veya florokinolonu içermelidir. Çoklu antibiyotik dirençli suşlarla gelişen enfeksiyonlarda ise kolistin kullanımını destekleyen çalışmalar vardır (54-56). Kolistin molekülünün temin edilemediği merkezlerde karbapenemlerin mümkün oldukça tedavide son seçenek olarak tercih edilmesi, antibiyotiğin selektif

baskısının ortadan kaldırılarak, karbapenem direncinin yaygınlaşmaması açısından önemlidir. Tedavi süresine, hastanın genel durumunun düzenli olarak uygun parametreler kullanılarak değerlendirilmesi ile karar verilmelidir (18).

Kistik fibrozisli olguların tedavileri ise halen açıklığa kavuşmamıştır. Kistik fibrozisli olgular erken yaşlardan itibaren *Pseudomonas* türleri ile kolonize olmakta ve verilen antibiyotik tedavilerinin selektif baskısı nedeni ile yaşla doğru orantılı olarak çoklu dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kistik fibrozisli olguların yakından takip edilerek *Pseudomonas* kolonizasyonunun erken tanısının konması ve ilk izolasyonların tedavisinin yapılması ve kolonize hastaların izolasyonu anahtar faktörlerdir (57-59). Tedavi inhale kolistin veya aminoglikozit ve/veya oral siprofloksasinle yapılabilir (60-62). Ancak tedavi başarısızlığının %20' ler civarında olduğu tahmin edilmektedir (58, 60, 63). Kronik kolonizasyon veya enfeksiyon gelişen olgularda ise antibiyotik duyarlılık durumuna göre ve sıklıkla yüksek dozlarda antibiyotik tedavileri endikedir (64).

*Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinde halen kombinasyon tedavilerinin etkinliği ve tedavi süreleri hakkında farklı görüşler bildirilmektedir. Çoklu antibiyotik direnci olmayan *Pseudomonas* suşları ile gelişen sepsis ve ventilatör ilişkili pnömoni olgularında, antibiyotik duyarlılık verilerine göre tedavi başlanması durumunda kombinasyon tedavilerinin üstünlüğü gösterilememiştir (65, 66). Chastre ve ark. 15 günlük tedavi rejimine göre sekiz günlük kısa bir tedavi süresinin dahi yeterli olabileceğini ifade etmişlerdir (67). Çoklu antibiyotik direnci olan suşlarla gelişen enfeksiyonlarda ise kombinasyon tedavileri olguya göre bireysel olarak düzenlenmelidir (68). Ancak bu tür enfeksiyonlarda tedavi sürelerinin değerlendirildiği çalışmalar henüz yoktur.

### **2.3.2. *Acinetobacter* Türleri:**

*Acinetobacter* türleri de *Pseudomonas* türleri gibi doğada toprakta ve nemli ortamlarda bulunur. Hastanelerde ise özellikle ventilatörler başta

olmak üzere yoğun bakımlarda hemen her türlü nemli ortamdan izole edilebilir. Hastane florasına yerleşmiş olan türler çoklu antibiyotik direnç potansiyeline sahiptir. Genelde immün sistemin baskılandığı durumlarda enfeksiyona neden olur ve son derece ağır seyreder.

### **Epidemiyolojik ve klinik özellikleri:**

*Acinetobacter* türleri içerisinde hastane enfeksiyonları açısından en önemli yere *A. baumannii* sahiptir. *A. baumannii* yoğun bakım hastalarında birçok enfeksiyona neden olmakla beraber neden olduğu en önemli hastalık nozokomial pnömonidir (69). Yanık yarası enfeksiyonlarında giderek artan sıklıkta bildirilmeye başlanmış ve bazı merkezlerde yanıktan ikinci günden sonra en sık enfeksiyona neden olan bakteri konumundadır (70). *A. baumannii* pnömonisi, mekanik ventilasyon, yoğun bakımda takip edilme ve önceden geniş spektrumlu antibiyotik (3. kuşak sefalosporinler, florokinolonlar ve karbapenemler) kullanımı gibi risk faktörleri olan hastalarda ortaya çıkar (71). Klinik örneklerden izole edilen organizmaların kolonizasyon ya da etken olup olmadığını değerlendirmek özellikle ventilatör ilişkili pnömoni olgularında son derece zordur (72). Bununla birlikte entübe edilen hastalarda gelişen ventilatörle ilişkili pnömoni olgularının başta gelen nedenidir. Hastanemizde 2005 yılında izole edilen mikroorganizmaların %6.2'sini *Acinetobacter* türleri oluşturmuştur (73).

*Acinetobacter* türlerine karşı en etkili antibiyotikler karbapenemler olmakla beraber son yıllarda dünya çapında ve ülkemizde giderek artan bir direnç problemi ile karşılaşılmaktadır (30, 35, 41, 74, 75). Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri ülkeden ülkeye ve hatta merkezden merkeze büyük değişiklik gösterir (69). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncini ülkemizde %25-%65 arasında bildiren çalışmalar yapılmıştır (30, 33, 41, 75-77). Amerika Birleşik Devletleri'nde %6,3-37 arasında direnç oranları bildirilmiştir (34, 78). Avrupa'da bu oran %29 ile %33 arasında saptanmıştır (35) (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. *Acinetobacter* suşlarının farklı çalışmalardaki antibiyotik direnç oranları.

Çalışmacılar	Yıl	Ülke	CAZ (%)	IMP (%)	AG (%)	Kinolon (%)
Çetin ve ark.(76)	2006	Türkiye	85,3	43,3	50,8	93
Gazi ve ark.(77)	2005	Türkiye	70,3	62,2	47,7	68,5
Akçam ve ark(33)	2006	Türkiye	16	65,8	60,5	36,8
Zarakolu ve ark(30)	2006	Türkiye	78	52	-----	71
Bayram ve ark.(38)	2006	Türkiye	100	63,5	85,1	56,7
Rhomberg ve ark (39)	2003	ABD	36	8	37	41
Turner ve ark(40)	2002	Avrupa	45	17	33	56
Quale ve ark(79)	2003	ABD	99	37	44	87,5
Pascual ve ark(35)	2003	İspanya	83	33	81	86
Ardıç ve ark.(41)	2003	Türkiye	65	23	65	50

ABD: Amerika Birleşik Devletleri, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, AG: Aminoglikozit

### Antibiyotik direnç mekanizmaları:

*Acinetobacter* suşlarında  $\beta$ -laktam direnci başlıca kromozomal veya plazmid kaynaklı  $\beta$ -laktamaz üretimi sonucu gelişir. Bununla beraber dış membran geçirgenliğinde azalma ve penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik diğer etkili mekanizmalardır.

Kromozomal Amp-C sefalosporinaz üretimi  $\beta$ -laktamlara dirençte önemli bir rol oynar. Plazmid kaynaklı  $\beta$ -laktamaz üretimine örnek olarak; TEM-1, TEM-2, OXA-21 ve OXA-37 ile PER-1, VEB-1 gibi GSBL enzimleri sayılabilir. Bu enzimler karbapenemleri parçalayamaz. Ancak yine plazmid kaynaklı dirençte giderek artan öneme sahip metallo  $\beta$ -laktamazlar karbapenemaz aktiviteleri ile dikkat çekmektedir. Yine OXA grubundan D sınıfı bazı enzimlerin de karbapenem direncine katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (80-82). Dış kaynaklı (örneğin plazmid kaynaklı) direnç genlerinin bakteri tarafından alınması antibiyotiklerin seçici baskısına bağlıdır. *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde,

hastane ortamında sürekli antibiyotik baskısına maruz kalmaları sonucu GSBL sıklığı son derece yaygındır (48).

Aminoglikozitlere karşı *Acinetobacter* türlerindeki başlıca direnç mekanizması enzimatik olarak antibiyotiğin hidroksil veya amino gruplarının değiştirilmesidir. Bu enzimler aminoglikozit sınıfındaki tüm antibiyotikleri, amikasin dahil, inaktive eder. Diğer direnç mekanizmaları arasında ribozomal hedef proteininin değişimi, hücre içine taşımada azalma ve eflüks pompa sistemi sayılabilir (72).

*Acinetobacter* türleri 1988 yılına kadar florokinolonlara aminoglikozitlerden ve geniş spektrumlu sefalosporinlerden daha duyarlı iken, hızlı direnç gelişimi nedeni ile kinolonlar günümüzde etkinliklerini yitirmişlerdir (69). DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki kromozomal mutasyonlar florokinolonların bu bölgelere etkinliğini ortadan kaldırmaktadır. Aynı zamanda ilacın hücre içine alım ve eflüks pompa sistemi de direnç gelişiminde rol oynayan diğer mekanizmalardır.

Penisilinlerin, sefalosporinlerin ve aminoglikozitlerin *A. baumannii* enfeksiyonlarında etkinliği çok azdır ya da hiç etkinliği yoktur (69).

### **Tedavi yaklaşımları:**

*Acinetobacter* enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri direnç sorunu nedeni ile son derece azalmıştır. Tedavi seçeneklerini irdeleyen kontrollü, randomize çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak retrospektif çalışmalarda pnömoni ve bakteriyemi olgularında ampisilin-sulbaktam monoterapisinin imipenem mono terapisine yakın klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında ise yeni tedavi arayışları sulbaktam, kolistin (polimiksin B), doksisiklin ve minosiklin gibi eski ilaçları ve tigesiklin adlı yeni bir molekülü gündeme taşımıştır. Kolistin, imipenem veya rifampisini içeren ikili veya üçlü sinerjistik ilaç kombinasyonlarının dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir (82). İmipeneme orta düzey (< 16 µg/ml) dirençli suşlarda sulbaktam halen etkili bir tedavi seçeneği iken, yüksek düzey imipenem direnci (≥ 32 µg/ml ) gösteren suşlarda kolistin tercih edilebilir (83).

### 2.3.3. Diğer Klinik Öneme Sahip Gram Negatif Non Fermentatif Bakteriler ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

#### Stenotrophomonas türleri

*Stenotrophomonas* cinsinin hastane enfeksiyonları açısından önem taşıyan türü *Stenotrophomonas maltophilia*' dir. İzolasyon oranlarında 1970' lerden itibaren bu bakterinin izolasyon oranlarında artış gözlenmektedir (84). *S. maltophilia* özellikle kistik fibrozis, immün supresyon, organ transplantasyonu ve malignite gibi eşlik eden hastalığı olanları etkiler (85). Mikroorganizma en sık solunum yolu örneklerinden izole edilmekle birlikte çoğu zaman kolonizasyon olarak karşımıza çıkar (69). *S. maltophilia* enfeksiyonları genellikle yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkilidir.

*S. maltophilia* birçok antibiyotiğe dirençli olmasına rağmen, direnç mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamıştır.  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı dirençten öncelikle L1 ve L2 isimli iki adet kromozomal enzim sorumlu tutulmaktadır. L1 çinko bağımlı bir metallo  $\beta$ -laktamazdır,  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir, aztreonamı yıkmaz ve hemen hemen bütün izolatlar tarafından salgılanmaktadır. L2 ise özellikle sefalosporinaz aktivitesi gösterir, bir serin proteazdır,  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile inhibe olur (86-88).  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç gelişiminde hücre zarından azalmış geçişinde rolü olabilir (89).

Aminoglikozitlere direnç gelişiminde özellikle hücre zarının azalmış geçirgenliği sorumludur. (89). Bunun hücre zarındaki liposakkaritin fosfat konsantrasyonunu değiştirerek yaptığı düşünülmektedir (90).

Florokinolonlara direnç gelişiminde dış membran proteinlerindeki değişimler ve son yıllarda ortaya konan değişik çoklu ilaç direncine neden olan eflüks pompa sistemleri sorumludur. *P. aeruginosa*' daki MexAB-OprM eflüks pompa sisteminin homoloğu *S. maltophilia* izolatlarında da gösterilmiş ve florokinolonların yanı sıra  $\beta$ -laktamlara ve aminoglikozitlere de gelişen dirençten sorumlu olduğu saptanmıştır (89, 91).

Mikroorganizmada birçok antibiyotiğe karşı yüksek düzey içsel (kromozomal) direnç söz konusudur. Karbapenemler mikroorganizmaya karşı etkili değildir. Aminoglikozitler ise izolatların ancak %13,7 ile %16,8' ine etkilidir (92). Bu bakterilere karşı en etkili antibiyotikler arasında trimetoprim-sulfometaksazol ve yeni kinolonlar (gatifloksasin, moksifloksasin ve levofloksasin) sayılabilir. Tedavi seçenekleri arasında ilk başta trimetoprim-sulfometaksazol gelir. Direnç veya intolerans durumlarında ise tikarsilin-klavulanik asit bir seçenek olabilmektedir. Kombinasyon tedavileri ile ilgili veriler sınırlıdır ve daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Yeni kinolonlar ise tek başlarına veya diğer antibiyotiklerle kombine olarak *S. maltophilia* tedavisinde umut vericidir (93, 94).

### **Burkholderiae türleri**

İlk olarak 1950 yılında soğanın çürümmesine yol açan bir bitki patojeni olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları biyolojik haşere öldürücü (biopestisit) olarak etkin olduğu saptanmış ve tahılların korunmasına yardımcı olmak üzere ambarlarda kullanılmıştır.

*Burkholderia cepacia* adlı türün kistik fibrozisli hastalarda ciddi bir solunum yolu enfeksiyonu etkeni olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda daha önceden *B. cepacia* olarak adlandırılan türün 9 tane alt türünün olduğu tespit edilmiş ve nomenklatürde *B. cepacia kompleks* (Bck) olarak adlandırılmıştır. Doğal çevrede yaygın olarak bulunması, sıra dışı metabolizması ve dezenfektanlar dahil son derece zor çevre koşullarında bile hayatta kalabilmesi nedeni ile hastane enfeksiyonlarına ve hatta salgınlara yol açmaktadır. Hastane salgınları ile ilgili göreceli olarak az bildirim vardır ve sıklıkla salgın kaynağı saptanamamaktadır (95). Ancak tıbbi solüsyonlar ve ultrason jeli kaynaklı salgın bildirimleri dikkat çekicidir (96-99).

*Burkholderia cepacia kompleks* için sınırlı sayıda antibiyotiğin etkinliği vardır. Yapılan bir çalışmada trimetoprim-sulfometaksazol %90,7, meropenem %82,1, seftazidim %81, levofloksasin %69,1 piperasilin-tazobaktam %68,8 oranında etkin bulunmuştur. İlginç olarak dirençli

*Pseudomonas* enfeksiyonlarında etkin olan polimiksin B' nin, *Burkholderia* türlerine karşı sadece %12,1 oranında etkinlik göstermektedir (92).

*Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*) kompleks dış membran geçirgenliğinde azalma, antibiyotik geçiş kanallarının bulunmaması (self-promoted uptake; gentamisin, tobramisin, kolitsin ve EDTA' nın hücre içine alımından sorumludur), eflüks pompa sistemi ve  $\beta$ -laktamaz enzimleri gibi birçok direnç mekanizmasını kullanabilir (100).

#### **2.4. Beta Laktamazlar ve Kazanılmış Metallo Beta Laktamaz (MBL)' ların Önemi**

Beta laktamazlar benzer yapıya sahip globüler proteinlerdir. Aminoasit dizilerinin benzerliğine göre (Ambler sınıflaması) veya substrat ve inhibitör profillerine göre (Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması) sınıflandırılabilirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda en sık Ambler sınıflaması kullanılır (Tablo 2.6).

*Acinetobacter* suşlarında beta laktam grubu antibiyotiklere karşı önde gelen direnç mekanizması beta laktamaz enzimleridir. *Pseudomonas* suşlarında ise permeabilite değişiklikleri ile beraber beta laktamaz üretimi beta laktam direncinde önemli bir yere sahiptir. Karbapenemaz aktivitesi olmayan beta laktamaz enzimlerinde karbapenemler halen bir tedavi seçeneği iken, karbapenemaz aktivitesi gösteren beta laktamazların varlığında karbapenemler etkinlikten yoksundurlar. Plazmidler aracılığı ile aktarılabilen karbapenem direncine kazanılmış karbapenem direnci denir.

Kazanılmış karbapenem direncine neden olan enzimler (karbapenemazlar) Ambler A, B ve D grubunda yer alır. A ve D sınıfında yer alanlar aktif serin-bölgeli enzimlerdir. A grubundakiler *Serratia marcescens* ve *Enterobacter cloacae*' da kromozomal (NMC-A, Sme-1-3, IMI-1) veya *Klebsiella pneumoniae* (KPC-1) ve *P. aeruginosa*' daki (GES-2) gibi plazmid kaynaklı olabilir. En önemli grup olan Ambler B grubunda metallo beta-laktamaz enzimleri yer alır. İlk kazanılmış MBL varyantları 1990' ların başında Japonya' da ortaya çıkmıştır (9). Dünyanın pek çok

yerinden 1990' ların ortasından itibaren bildirimler olmuştur. Avrupa MBL olumlu izolatların en çok bildirildiği coğrafyadır (101).

Tablo 2.6. Beta laktamaz sınıflama şemaları.

#### **Ambler sınıflaması**

<b>A sınıfı</b>	Penisilinazlar (GSBL)
<b>B sınıfı</b>	Metallo beta laktamazlar (çinko)
<b>C sınıfı</b>	Sefalosporinazlar (AmpC, indüklenebilir beta laktamazlar)
<b>D sınıfı</b>	Oksasilinazlar (Serin beta laktamazlar)

#### **Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması**

<b>Grup 1</b>	Sefalosporinazlar (klavulanat dirençli, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder)
<b>Grup 2</b>	Hepsi klavulanik asit duyarlı
2a	Penisilinazlar
2b	Dar spektrumlu penisilinazlar
2be	GSBL
2br	İnhibitör dirençli (TEM) enzimler
2c	Karbenisilin yıkan enzimler
2d	Oksasilin yıkan enzimler
2e	Klavulanat ile inhibe olan sefalosporinazlar
2f	Karbapenemazlar (KPC-1, SME-1)
<b>Grup 3</b>	Metallo beta laktamazlar (IMP, VIM)
<b>Grup 4</b>	Diğerleri

IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM serisine ait 5 metallo enzim yer alır. IMP grubunda 22, VIM grubunda 13 diğerlerinde ise bir tane alt enzim grubu tanımlanmıştır (102). Polimeraz zincir reaksiyonunda VIM grubu dışındakiler tek primer çifti ile saptanabilirken, VIM grubunda iki adet

primer çifti gerekmektedir. Bunlar aktivite gösterebilmeleri için çinko iyonuna gerek duydukları için “metallo enzimler” olarak adlandırılmışlardır.

D grubunda yer alan karbapenemazlar ise özellikle *A. baumannii*’ de tanımlanmıştır. Bunlar arasında OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-51 ve OXA-58 yer alır (103).

Kazanılmış metallo-beta laktamazlar (Grup B)  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin klinik kullanımını ciddi olarak kısıtlamaktadır. Aztreonam hariç bütün  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumludurlar. Bu enzimler plazmidler aracılığı ile gram negatif bakteriler arasında yayılabilmektedir.

Disk difüzyon testi ile elde edilen fenotipik özelliklere göre MBL varlığının gösterilmesi mümkün değildir. Bu amaçla *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde ortamdaki çinkonun kimyasal maddelerle (EDTA, 2-merkaptopropiyonik asit gibi) bağlanarak metallo  $\beta$ -laktamaz aktivitesinin inhibisyonu temeline dayanan ve halen gelişmekte olan bazı testler tanımlanmıştır (104-109). Yayılım hızları, çeşitlilikleri ve çok sayıda türden izole edilmelerine rağmen, MBL’ ların tespitinde Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından onaylanmış tarama yöntemi henüz yoktur. Bunun başlıca nedeni tarama testlerindeki yalancı pozitiflik ve negatifliklerinin son derece yüksek olmasıdır (110). Literatürde tarama testinden sonra moleküler yöntemlerle doğrulama önerilmektedir (111). Plazmid kaynaklı metallo  $\beta$ -laktamaz enzimlerini kodlayan genlerin, in-vitro ortamda karbapeneme duyarlı olan bakterilerde de bulunabileceği bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda, karbapeneme dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde, MBL tarama testi olarak duyarlılığı ve özgüllüğünün daha yüksek ve laboratuvar pratiğinde kullanılabilecek olması nedeni ile “kombine disk testi” (101, 108), karbapeneme duyarlı izolatlarda ise Franklin ve arkadaşları tarafından tanımlanan yeni bir yöntem önerilmektedir (112).

MBL olumlu izolatların çoğalmas ve yaygınlaşması basit bir laboratuvar bulgusu olarak algılanmamalı, potansiyel bir tehdit unsuru olarak değerlendirilmelidir. Laboratuvarların MBL pozitif izolatları tanıyıp

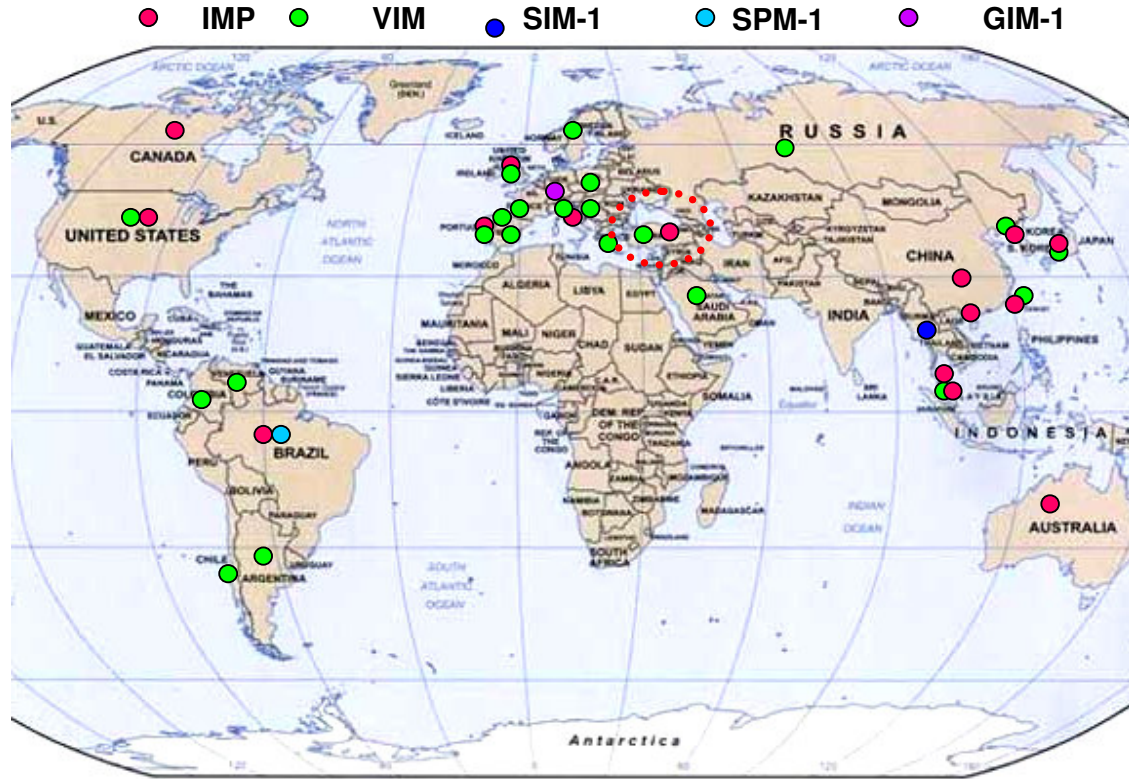
klınisyenleri bilgilendirmeleri gerekmektedir. MBL olumlu GNNFB izole edilen hastalarda antibiyotik duyarlılık fenotipi ne olursa olsun, öncelikli hedef bakterinin hastane ortamından eradikasyonu olmalı ve hastane içinde yayılımının önlenmesi için hastalar izole edilmelidir (101).

Ülkemizden günümüze kadar *Pseudomonas* türlerinde 2 adet (VIM) (113, 114), *Klebsiella* türlerinde 2 adet (IMP ve VIM) (113, 115) ve *Enterobacter* türlerinde ise 13 adet (1 tane VIM, 12 tane IMP) (113) olmak üzere toplam 17 adet MBL gen pozitifliği olan mikroorganizma bildirilmiştir. Ülkemizde *Pseudomonas* türlerinde IMP grubuna ait MBL pozitifliği ise halen gösterilememiştir.

Gram negatif mikroorganizmalar arasında (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri ve *Enterobacteriaceae*) MBL' ların hızlı yayılımı dünya genelinde epidemiyolojik ve klinik açıdan özel bir öneme sahiptir (Şekil). MBL olumlu GNNFB izole edilen hastalar incelendiğinde çoğunun daha önceden karbapenem kullanmadığı ancak geniş spektrumlu sefalosporinler gibi diğer  $\beta$ -laktam antibiyotikleri kullandığı görülür (101).

MBL olumlu GNNFB' in antibiyotik tedavisi halen çözümlenmemiş bir sorundur. Tek antibiyotikli protokollerin yerine kombinasyon tedavilerinin uygulanması yerinde olacaktır. İn-vitro veriler kolistin ve rifampisin kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğunu göstermiştir (101).

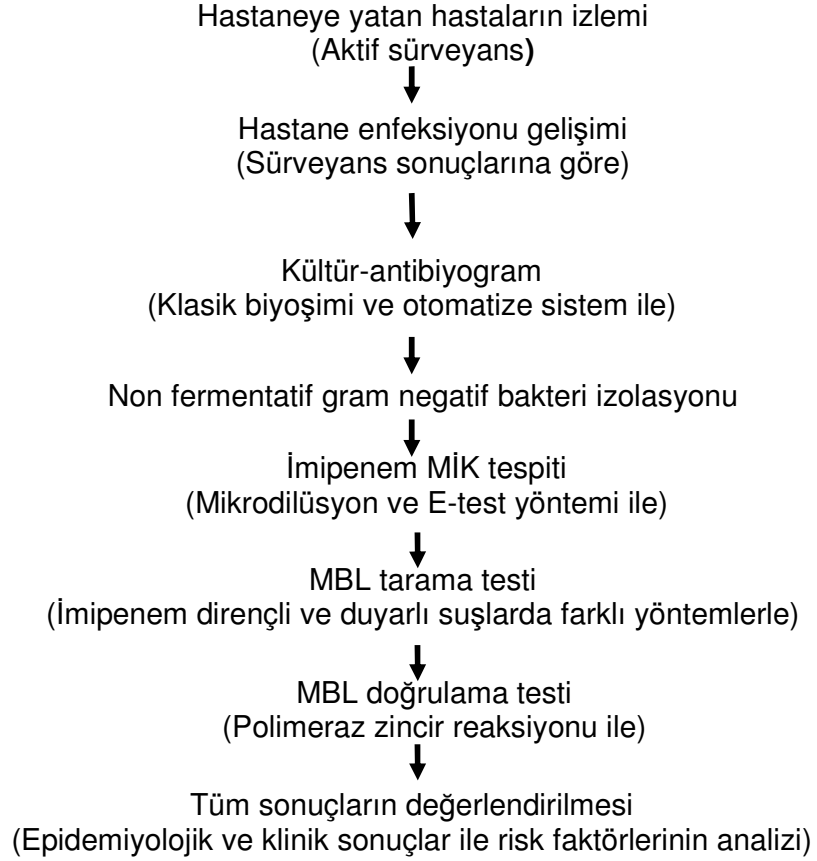
Sonuç olarak GNNFB' de permeabilite değişiklikleri, antibiyotiklerin enzimatik yıkımı ve hedef mutasyonu gibi direnç mekanizmaları antibiyotik direncinde rol oynamaktadır. GNNFB bu direnç mekanizmalarından bir çoğunu aynı anda kullanabilmekte ve bu durum çoklu ilaç direncine yol açmaktadır. Karbapenem direncinde permeabilite değişikliklerinin yanı sıra beta laktamazlar önemli rol oynamaktadırlar. Bunlardan özellikle metallo beta laktamazlar, bakteriler arasında kolayca aktarılabilmeleri, beta laktam antibiyotiklerin hemen hepsine karşı dirence yol açmaları (aztreonam hariç) ve dünyanın bazı bölgelerinde MBL olumlu GNNFB' in %15-70 oranlarında endemik hale gelmeleri bakımından (örneğin İtalya ve Belçika) çok önemli bir yere sahiptir (116-119) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Tanımlanan plazmid kaynaklı metallo-beta-laktamaz genlerinin dünya üzerinde dağılımı. (Metallo beta laktamazlar, Bal, Ç., KLİMİK 2005' den uyarlanmıştır)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Mart 2006-Nisan 2007 döneminde 1000 yatak kapasitesine sahip GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi' nin 6 yoğun bakım ünitesi (Anestezi, Genel Cerrahi, Nöroloji, Dahiliye, Beyin Cerrahisi, Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Servisleri; toplam 47 yatak), 12 yatan hasta servisi (İç Hastalıkları, Nöroloji, Hematoloji, Onkoloji, Gastroenteroloji, Kardiyoloji, Çocuk Hastalıkları, Enfeksiyon Hastalıkları, Genel Cerrahi, Plastik Cerrahi, Göz, Ortopedi; toplam 647 yatak) ve Yanık Servisi (9 yatak)' nde prospektif olarak yürütülmüştür. Çalışmamızın akış şeması Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması.

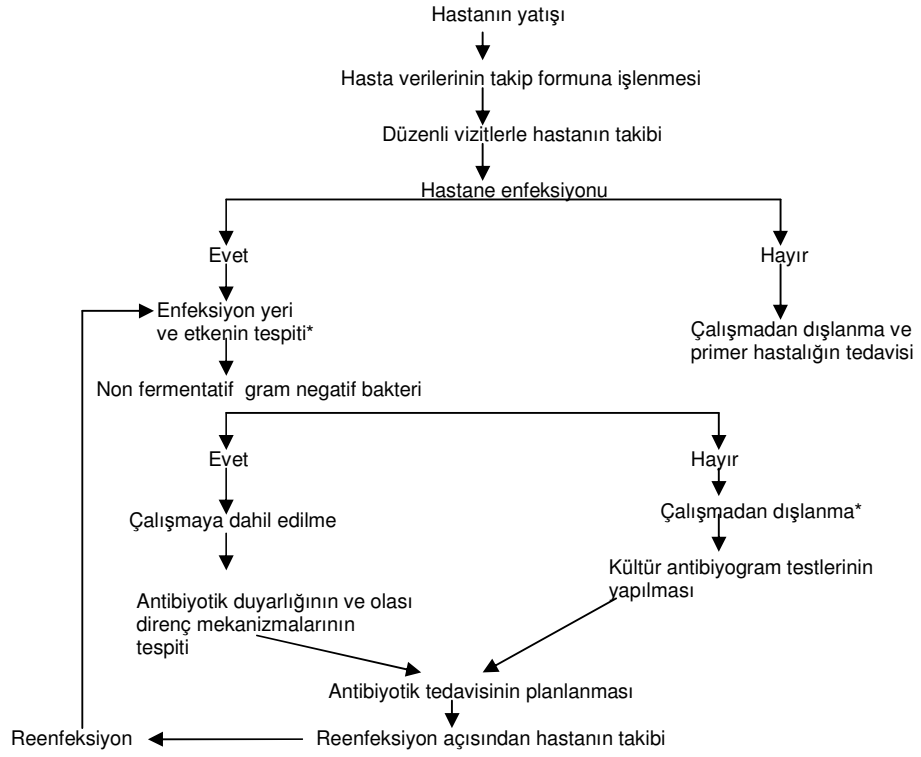
Olguların çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlanma kriterleri Tablo 3.1' de sunulmuştur. Çalışmaya alınma kriterlerinin tamamını karşılayan hastalar ve izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri.

<b>Çalışmaya alınma kriterleri</b>	<b>Çalışmadan dışlanma kriterleri</b>
1. Yatan hasta olması	1. Hastane enfeksiyonu ya da sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonu bulunmayanlar
2. Hastane enfeksiyonu ya da sağlık hizmetleri ile ilişkili bir enfeksiyonu olması	2. Toplum kaynaklı enfeksiyonu bulunanlar
3. GNNFB izole edilmesi	3. GNNFB dışı mikroorganizma ile enfekte olmak
4. İzolatın kolonizasyon, kontaminasyon veya tekrarlayan izolat olmaması	4. İzole edilen mikroorganizmanın etken olarak değerlendirilmemesi

### 3.1 Hastaların İzlemi:

Hastanemizde yatarak tedavi gören hastalar aktif sürveyans yöntemi ile izlenmiştir. Hastaların demografik bilgileri, risk faktörleri, gelişen enfeksiyon türleri, etkenler, klinik uygulamalar ve sonuçlar kaydedildi. Günlük vizitelerde tespit edilen belirti ve bulgularla, hastalara ait laboratuvar sonuçları hastane enfeksiyonu gelişimi açısından, günde iki kez yapılan sürveyans toplantılarında, Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)/ABD kriterleri kullanılarak değerlendirildi. Hastane enfeksiyonu gelişiminden şüphelenilen durumlarda gerekli kültür örnekleri alındı ve gecikme olmaksızın hastalık tablosunun ciddiyetine ve olası etkene göre ampirik veya preemtif tedavi protokolleri, güncel antibiyotik duyarlılıkları kapsamında başlandı. Hasta takibinde izlenen yöntem ise Şekil 3.2' de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Hasta takip algoritması.

### 3.2 Laboratuarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler

#### Gereçler:

1. Petri kabı 10 mm, tek kullanımlık 2000 adet
2. Öze ve öze ucu (iğne ve 10 µl kalibre)
3. Pamuklu eküvyon 1000 adet
4. Etüv
5. Otoklav
6. Pastör fırını
7. Balon joje, 100 ml, 1000 ml
8. Tartı, 1/1000 gr
9. Mikropipet ve steril pipet uçları, 1-10 µl, 5-100 µl, 100-1000 µl.
10. Çok uçlu mikropipet 50-200 µl.
11. Pipet ucu, DNaz, RNaz içermeyen steril, 0-10 µl, 10-100 µl

12. Cam tüp, 120X10 mm
13. Cetvel
14. Pens
15. Vorteks cihazı
16. McFarland lm cihazı
17. Derin dondurucu, -80 °C
18. In-house PZR ekipmanları
19. Ependorf saklama godeleri
20. Kum boncuğu (bujiterilerden temin edilen)

**Malzemeler:**

1. Mueller Hinton Agar toz, 2 kutu, 1000 gr
2. Koyun kanlı agar hazır, 500 adet
3. Hazır antibiyotik diskleri (imipenem, meropenem, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam, aztreonam, gentamisin, amikasin, netilmisin, seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefepim, siprofloksasin, levofloksasin, tobramisin, doksisisiklin, minosiklin. Piyasadan, CLSI/ABD nerilerine göre uygun konsantrasyonda antibiyotik içeren diskler kullanılmıştır)
4. Filtre kağıdı
5. Delikli zımba
6. Gliserol 50 ml
7. Di-sodyum etilendiamintetraasetikasit (EDTA)
8. E-test şeritleri, imipenem 100 adet
9. İmipenem baz, 100 mg
10. Hidroklorik asit
11. Distile su
12. Primerler (IMP ve VIM)
13. Agaroz, Polimeraz Zincir Reaksiyonu jel görüntüleme için
14. DNA izolasyon kiti
15. dNTP mix 10 mM

16. Etidium bromid
17. DNA ladder 100 bp ölçekli
18. Taq DNA Polimeraz 1500 Ü

### **3.3 Mikroorganizmaların Tanımlanması:**

Çalışma süresince bakterilerin izolasyonu, tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının tespiti, MBL tarama ve doğrulama testleri Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi ve İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi laboratuvarlarında yapılmıştır.

Hastane enfeksiyonu gelişen hastalardan alınan kültür örnekleri uygun besiyerlerine ekildi. Kan kültürü vasatları bir haftaya kadar, diğerleri ise 24 saat 37°C' de inkübe edildi. Belirtilen sürelerde üreme olan besiyerlerindeki kolonilerden gram boyama, oksidaz testi, antibiyogram için pasaj ve konvansiyonel biyoşimik testler için besiyerlerine (TSI, üre, metil red, indol, hareket ve sitrat) ekim yapıldı. Gram boyamada gram negatif basil ve kok (bazı Acinetobacter türleri) morfolojisi gösteren, TSI besiyerinde dipte ve yatık alanda asit oluşumu (sarı renk) gözlenmeyen bütün izolatlar olası gram negatif non fermentatif izolat olarak değerlendirildi. Bu izolatlar API (GN/Biomerieux-Fransa) veya BBL Crystal gram negatif/NF Kit ID (BD-İngiltere) sistemleri kullanılarak GNNFB oldukları doğrulandı.

### **3.4 Mikroorganizmaların Antibiyotik Direncinin Saptanması**

#### **3.4.1 KIRBY BAUER DİSK DİFÜZYON TESTİ**

İzolatların antibiyogram çalışması Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006/ABD kriterleri uyarınca yapıldı. Mueller Hinton agar (Biomerieux-Fransa) toz besiyerinden üreticinin önerisine göre hazırlanan besiyerleri otoklavlandıktan sonra 100 mm çaplı plastik petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Hazırlanan petriler kullanılıncaya kadar 4°C' de muhafaza edildi.

Antibiyotik duyarlılığı test edilecek bakterinin kanlı agardaki 24 saatlik kolonileri salin solüsyonu içinde 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Steril pamuklu eküvyon kullanılarak hazırlanmış olan Mueller-Hinton agar yüzeyine antibiyogram ekimi yapıldı. Ekim işlemi biten petri kabı kapağı üstte olacak şekilde fazla nemi emmesi için 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Antibiyotik diskleri merkezden merkeze en az 24 mm aralıkla ve petri başına en fazla 5 disk olacak şekilde yerleştirildi. 37°C' de 18 saat inkübasyondan sonra oluşan zon çapları ölçüldü. CLSI 2006 kriterleri doğrultusunda imipenem için 16 mm ve daha fazla zon çapı, diğer antibiyotikler için de belirtilen sınır değerlerin üstü duyarlı kabul edildi.

### **3.4.2 Mikrodilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerinin Saptanması**

İzole edilen ve etken olarak değerlendirilen mikroorganizmalarda imipenem için MİK tespiti sıvı (broth) mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI 2006 kriterleri doğrultusunda yapıldı. Agar dilüsyon yöntemi, imipenemin ısıya son derece hassas bir molekül olması nedeni ile tercih edilmedi. Anılan kriterler uyarınca, 32 µg/ml yüksek düzey direnç, 16 µg/ml ve üstü dirençli, 8 µg/ml orta duyarlı ve 4 µg/ml ve altı imipeneme duyarlı olarak değerlendirildi. Yaklaşık 100 ml Mueller Hinton sıvı besiyeri üreticinin talimatları doğrultusunda 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak hazırlandı.

Öncelikle antibiyotik konsantrasyonu 3200 µg/ml olacak şekilde fosfat tampon (pH= 7,2, 0,01 mol/l) ile stok antibiyotik solüsyonu hazırlandı. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı ve 6 ml fosfat tampon solüsyonuna %45,7 potensi olan 42 mg antibiyotik tozu eklenerek işlem gerçekleştirildi (Formül 3.1). Daha sonra stok solüsyondan 2 ml alınarak 2 ml fosfat tampon ile dilüe edildi ve 1600 µg/ml' lik stok solüsyon elde edildi. Aynı şekilde bu tüpten alınan 2 ml stok solüsyonu tekrar 1/1 oranında dilüe edildi ve 800 µg/ml solüsyon elde edildi. En son olarak bu tüpte de aynı işlem tekrarlandı ve 400 µg/ml konsantrasyonunda test için kullanılacak asıl stok solüsyon elde edildi. Stok solüsyonlar kuyucuklara

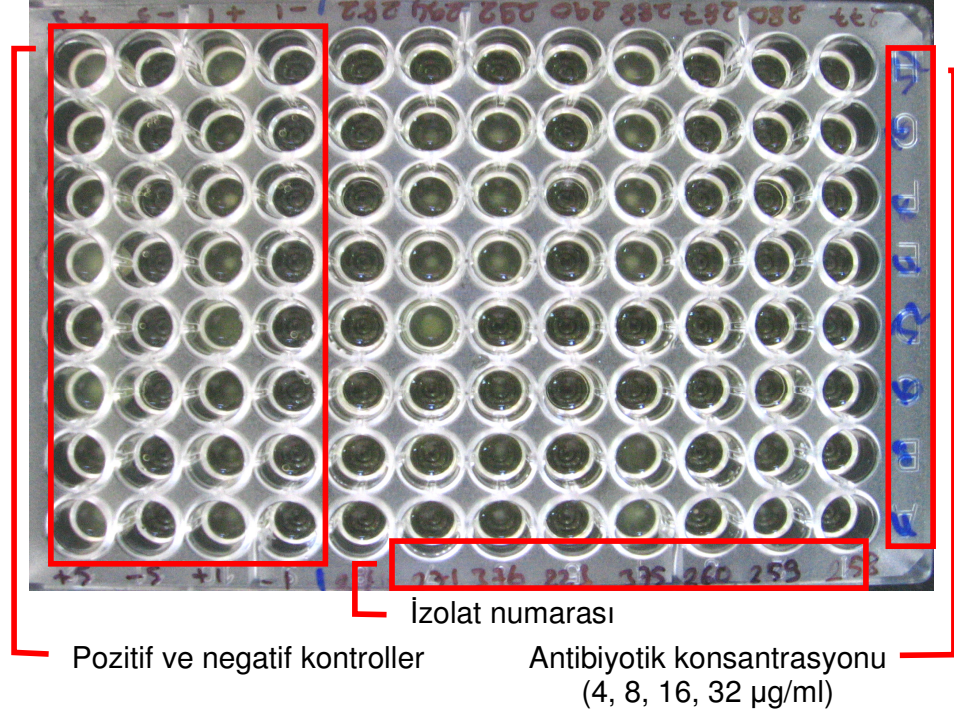
eklenmeden önce 1/10 oranında tekrar dilüe edilerek 320, 160, 80 ve 40 µg/ml' lik solüsyonlar hazırlandı. Bu işlemlerin bütün aşamalarında antibiyotik solüsyonunun bozulmasını engellemek için solüsyonu içeren kaplar buz akülerden yararlanılarak +4 ile +8 °C arasında tutuldu.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{hacim (ml)} \times \text{konsantrasyon (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potens (}\mu\text{g/mg)}} \quad (3.1)$$

Koyun kanlı agarda pasajlanmış mikroorganizmaların 18–24 saatlik taze kültürlerinden öze yardımı ile koloniler alınarak 2 ml salin solüsyonunda süspanse edildi. Cihaz yardımı ile bulanıklık 0,5 McFarland' a ayarlandı. Bu sayede  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml (CFU; colony forming unit) olacak şekilde bakteri konsantrasyonu elde edildi. Daha sonra hazırlanan süspanسیون 1/20 oranında dilüe edildi ve  $5 \times 10^6$  CFU/ml şeklinde bakteri konsantrasyonu oluştu. Doksanaltı (8 X 12) kuyucuklu ve kuyucuk hacmi 0,2 ml olan ELISA plaklarının her bir kuyucuğuna Mueller Hinton sıvı besiyerinden 8' li otomatik pipet ile 90 µl eklendi. Daha sonra ELISA plaklarının uzun eksenini boyunca önce 40 ve ardından sırası ile 80, 160 ve 320 µg/ml' lik antibiyotik solüsyonlarından yine 8' li otomatik pipet yardımı ile 10' ar µl eklendi. Böylece kuyucuklardaki son antibiyotik konsantrasyonları sırası ile 4, 8, 16 ve 32 µg/ml oldu. Sekizli otomatik pipet, hem kontaminasyon riskini azaltmak hem de işlem zamanını kısaltarak antibiyotiğin ısıya daha az maruz kalmasını sağlamak amacı ile tercih edildi. Hazırlanan plakların üstü derhal parafilm ile kaplandı ve (-) 80°C' de kullanılıncaya kadar veya 2 ay süre ile saklandı.

Kullanılacak plaklar derin dondurucudan çıkarıldı ve kuyucuklardaki sıvının erimesi için yaklaşık 15 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmış olan  $5 \times 10^6$  CFU/ml' lik bakteri süspanسیونundan 10 µl pipetlendi ve toplam 5 kuyucuğa (4 adet MİK testi ve 1 adet pozitif kontrol kuyucuğu) ekim yapıldı. Pipetle kuyucuk içinde 4–5 kez aspirasyon yapılarak iyice karışması sağlandı ve en son aspire edilen 10 µl atıldı. Böylece en son hacim 100 µl' de sabit tutuldu. Sonunda

inoküle edilen bakteri konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/ml oldu. Hazırlanmış mikrodilüsyon plağının görünümü şekil 3.3' dendir.



Şekil 3.3. 8x12 boyutundaki plakta antibiyotik dilüsyonları, pozitif - negatif kontroller ve bakterilerin yerleşimi.

Plaklar üstü parafilmle kaplı olacak şekilde (buharlaşmayı önlemek amacı ile)  $37^\circ\text{C}$ ' de 16-20 saat inkübe edildikten sonra etüvden çıkarılarak gözle değerlendirildi. Üreme olan kuyucuklarda dipte çökelti şeklinde bakteriler izlendi (Şekil 3.3). Üreme gözlenmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu içeren kuyucuk bakterinin MİK değerinin saptanmasında kullanıldı.

### 3.4.3 İmipenem E-Test Şeritleri ile MİK Değeri Doğrulaması

Mikrodilüsyon yönteminde imipeneme yüksek düzey direnç gösteren etkenler ile metallo  $\beta$ -laktamaz varlığı saptanan etkenlerde doğrulama amacıyla E-test yöntemiyle MİK değerleri araştırıldı. 18-24 saatlik koyun kanlı agardaki bakteri kolonileri steril salin solüsyonu

içerisinde bulanıklık 0,5 McFarland olacak şekilde süspansiyon edildi. Daha sonra oda ısısındaki Mueller Hinton agar besiyerine pamuklu eküvyon yardımı ile disk difüzyon duyarlılık testinde olduğu gibi ekildi. İmipinem E-testi rakamları üste gelecek şekilde plağın ortasına steril bir şekilde bırakıldı. 37°C' de 16-20 saat inkübasyondan sonra plaklardaki inhibisyon zonları değerlendirildi.



Şekil 3.4. İmipinem duyarlı bir *P. aeruginosa*'da E-test ile izlenen MİK değeri (0,5 µg/ml).

### 3.5 Metallo Beta Laktamaz Tarama Testleri

#### 3.5.1 Karbapenem duyarlı izolatlarda MBL tarama testi

Tarama testi olarak 10 mm çapındaki bir Mueller Hinton agar petrisinde çift disk sinerji, kombine disk testi ve aztreonam duyarlılığını aynı anda değerlendiren yöntem uygulandı (112). Kanlı agardaki 24 saatlik taze bakteri kolonileri steril salin solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığı elde edilinceye kadar süspansiyon edildi. Daha sonra bu süspansiyon 1/10 oranında tekrar dilüe edilerek Kirby Bauer disk difüzyon testinde değerlendirildiği gibi Mueller Hinton agar yüzeyine ekildi.

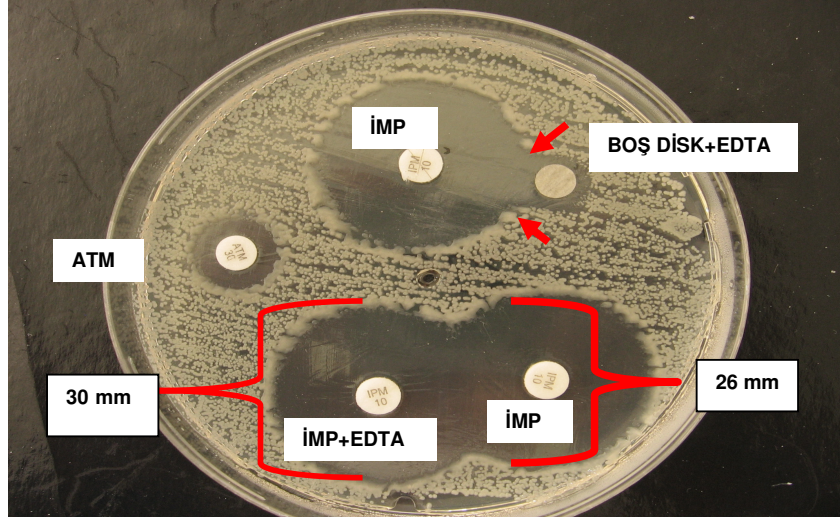
Kombine ve çift disk sinerji testlerinde laboratuvarımızda hazırlanan 0,1 molar (M) konsantrasyondaki EDTA kullanıldı. Bunun için molar ağırlığı 372,2 gr olan disodyum EDTA' dan (Sigma/ABD) 37,22 gr 1000 ml distile su içinde çözüldü. Disodyumun molekül ağırlığı çıkarıldığında çözelti içerisindeki EDTA' nın molekül ağırlığı 292,2 gr idi.

Kombine disk testi için iki adet 10 µg imipenem içeren antibiyogram diski (Becton Dickinson/ABD) aralarındaki mesafe merkezden merkeze 25 mm olacak şekilde agar yüzeyine yerleştirildi. Disklerden birine 0,1 molar di-sodyum EDTA çözeltisinden 10 µl mikropipet yardımı ile damlatıldı (292 µg EDTA). İnkübasyon sonunda kombine disk testinde EDTA içeren diskin etrafındaki duyarlılık zon çapının EDTA içermeyen diskin etrafındaki zon çapından 4 mm ve daha büyük olması MBL varlığı açısından anlamlı kabul edildi.

Çift disk sinerji testi için bir adet 10 µg imipenem içeren antibiyogram diski (Beckton Dickinson/ABD) ve bir adet de antibiyotik içermeyen boş disk kullanıldı. Boş disk laboratuvar ortamında kalın bir filtre kağıdının delikli zımba ile delinmesi sonucu 6 mm çaplı zımba kalıntılarından elde edildi. Bunlar cam petri kabına kondu, etrafı kağıtla sarıldı ve otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale getirildi. İmipenem diski ve boş disk aralarındaki mesafe merkezden merkeze 20 mm olacak şekilde agar yüzeyine yerleştirildi. Boş diskin üstüne yine 0,1 molar di-sodyum EDTA çözeltisinden 10 µl mikropipet yardımı ile damlatıldı. İnkübasyon sonunda imipenem diski duyarlılık zon çapı sınırlarında üzerine EDTA damlatılmış boş diske bakan tarafında en ufak bozulma MBL varlığı açısından anlamlı kabul edildi.

Son olarak 30 µg aztreonam içeren antibiyotik diski agar yüzeyine yerleştirildi. İnkübasyon sonunda 30 mm ve daha büyük duyarlılık zon çapı da MBL varlığı açısından anlamlı kabul edildi.

Çift disk sinerji, kombine disk veya aztreonam testinden birisindeki 35°C' de 16 saat inkübasyon sonrası elde edilen anlamlı sonuç tarama testi pozitifliği olarak değerlendirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: İmipeneme duyarlı izolatlarda MBL tarama testi.

### 3.5.2 Karbapenem dirençli izolatlarda MBL tarama testi

MBL taraması karbapenem dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde Yong ve arkadaşları tarafından tanımlanan kombine disk testi ile yapıldı (108).

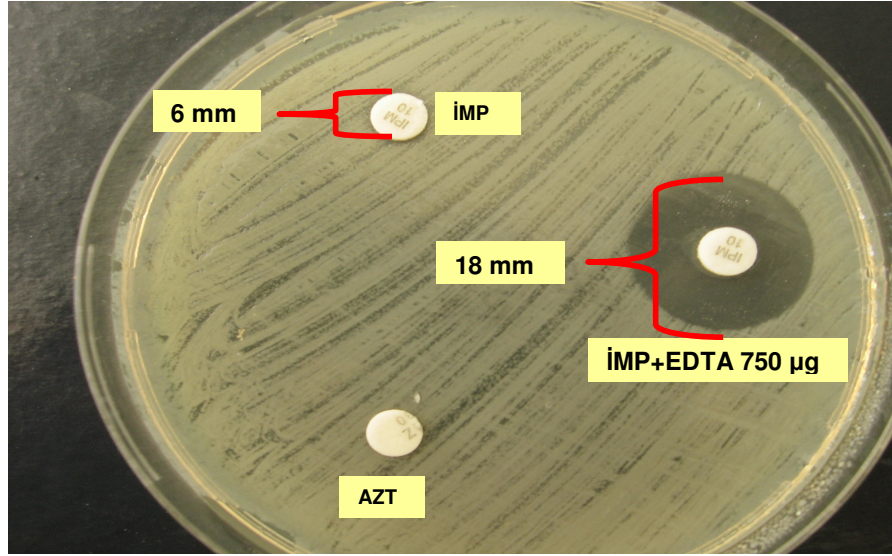
Bakterilerin kanlı agardaki 24 saatlik taze kolonileri steril izotonik salin solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland bulanıklık elde edilinceye kadar süspanse edildi. Daha sonra disk difüzyon testinde olduğu gibi Mueller Hinton agar yüzeyine ekim yapıldı.

10 µg imipenem içeren iki adet antibiyogram diski aralarında merkezden merkeze en az 40 mm mesafe olacak şekilde Mueller Hinton agar yüzeyine yerleştirildi.

186,1 gr di-sodyum EDTA 1000 ml distile su içerisinde çözülerek 0,5 molar bir çözelti elde edildi. NaOH kullanılarak çözeltinin pH' ı 8,0 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra besiyerinin yüzeyindeki disklerden birisine hazırlanan 750 µg EDTA eklendi.

Ayrıca plağa bir de aztreonam diski yerleştirilerek olası pozitifliklerde saf metallo  $\beta$ -laktamaz aktivitesinin gözlenmesi de amaçlandı.

37 °C' de 18 saat inkübasyondan sonra EDTA içiren imipenem diski etrafındaki duyarlılık çapının, EDTA içermeyen imipenem diskinin etrafındaki zon çapından 7 mm ve daha büyük olması tarama testi pozitifliği olarak değerlendirildi (Şekil 3.6).



İMP: İmpenem, AZT: Aztreonam

Şekil 3.6. İmpeneme dirençli izolatlarda MBL tarama testi.

### 3.6 Tarama Testi Olumlu Etkenlerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) İle Metallo Beta Laktamaz Direnç Geni Varlığının Araştırılması

#### 3.6.1 DNA Saflaştırma

Çalışmada DNA saflaştırmasında yaygın olarak kullanılan basit ve ucuz bir yöntem olan standart kaynatma yöntemi tercih edilmiştir.

Standart kaynatma yöntemiyle DNA saflaştırma için sıvı besiyerinde bir gecelik inkübasyonun ardından bakteri kültürlerinden 1 ml eppendorf tüplerine aktararak 3000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiş, üst sıvı atılarak

bakteriler 500 µl Tris-EDTA tamponu (10mM TRIS-HCL [pH:8.0], 1mM EDTA) içerisinde süspansiyon edilmiştir. 12000 g'de 5 dakikalık santrifüjün ardından üst sıvı uzaklaştırılmış ve örnek yeniden 500 µl Tris-EDTA ile süspansiyon edilmiştir. Bu işlemin 2 kez tekrarının ardından süspansiyon edilmiş bakteriler 100°C'lik ısı bloğunda 15 dakika inkübe edilmiş, takiben 12000 g'de 5 dakikalık santrifüj uygulanmıştır. Tüpteki üstte kalan sıvı yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve direkt olarak PZR için kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.6.2 Polimeraz zincir reaksiyonu

*bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>* tipi metallobetalaktamazların saptanması amacıyla standart "in-house" PZR yöntemi uygulanmıştır. Burada *bla<sub>IMP</sub>* türü enzimler için 5' - AAC CAG TTT TGC YTT ACY AT - 3' ve 5' - CGG CCK CAG GAG MGK CTT T - 3' (120); *bla<sub>VIM-1</sub>* türü enzimler için 5' - CTA CTC GGC GAC TGA GCG AT - 3' ve 5' - ATG TTA AAA GTT ATT AGT AGT - 3'; *bla<sub>VIM-2</sub>* türü enzimler için de 5' - ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG - 3' ve 5' - CTA CTC AAC ACT GAG CGA T - 3' primerleri kullanılmıştır (Y: C ya da T; K: G ya da T; M: A ya da C) (121). Hedeflenen gen bölgesinin amplifikasyonunda o gen bölgesine ait primerler, standart PZR karışımı hazırlanarak işleme alınmıştır.

PZR karışımı toplam 25 µl hacimde 1 µl bakteri DNA'sı, 12 µl PZR için onaylı steril distile su, 2.5 µl KCl içeren 10X PZR tamponu, 2.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl her bir deoksinükleotid trifosfattan (dATP, dGTC, dCTP, dTTP) içeren 2mM'lik solüsyon, her bir primerden 20 pm içerecek şekilde 0.75 µl primer ve 0.5 µl 5U Taq Polimeraz enzimi içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çoğaltma için de 94°C'de 5 dakikalık denatürasyonun ardından 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 56°C'de 45 saniye primer bağlanması, 72°C'de 60 saniye sentez basamaklarından oluşan toplam 35 sıcaklık döngüsü ve 72°C'de 7 dakikalık bir son sentez aşaması olan program "Thermal Cycler" cihazı kullanılarak uygulanmıştır.

PZR ürünlerinin saptanması amacıyla agaroz jel elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla % 1'lik agaroz jel, her 100 ml için 1 gr

agaroz, Tris-EDTA tamponu içerisinde eritilerek hazırlanmış, 10 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilmiş ve elektroforez tankına dökülerek katılaştırılmıştır. PZR ürünlerinin jele yüklenmesi ve 100 V'de 35 dakikalık elektroforezi takiben ultraviyole ışınları altında izlenen jelde;  $bla_{IMP}$  için 587 baz çiftlik (120) ve  $bla_{VIM}$  için 801 bazçiftlik ürünler (121) izlenen örnekler pozitif kabul edilmiştir.

### **3.7 İstatiksel analizler**

Verilerin özelliğine göre Sommer'd, Ki-kare, Man Whitney-U, Student-t testi ve Lojistik Regresyon Analizi kullanılarak SPSS 13.0 yazılımı ile değerlendirildi. P değerinin 0,05' den küçük olması anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR:

Çalışmamız süresince 6 yoğun bakım ünitesi (Anestezi, Genel Cerrahi, Nöroloji, Dahiliye, Beyin Cerrahisi, Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Servisleri [toplam 47 yatak, 1154 hasta]), 12 yatan hasta servisi (İç Hastalıkları, Nöroloji, Hematoloji, Onkoloji, Gastroenteroloji, Kardiyoloji, Çocuk Hastalıkları, Enfeksiyon Hastalıkları, Genel Cerrahi, Plastik Cerrahi, Göz, Ortopedi [toplam 647 yatak, 7456 hasta]) ve Yanık Servisi (9 yatak, 63 hasta)' nde 8673 hasta aktif sürveyans yöntemi ile izlenmiştir.

Çalışma süresi boyunca hasta yatış gün sayısı 64.800 gün olarak hesaplanmıştır. Aktif sürveyans ile izlenen tüm hastalarda 804 kültür pozitifliği olan hastane enfeksiyonu gelişmiş ve toplam hastane enfeksiyon hızı 12,4 / 1000 hasta yatış günü olarak saptanmıştır. Çalışma süresince izlenen ve hastane enfeksiyonu geliştiği değerlendirilen 542 hastaya ait 963 kültür örneğinden toplam 804 mikroorganizma soyutlandı. Bunlar içinde en fazla izole edilen bakteriler GNNFB idi (s= 276, %34). Bunu gram negatif bakteriler (s= 257, %32) izledi. Gram pozitif bakteriler %25 (s= 201), mayalar ise %9 (s= 70) oranında izole edildi. Hastane enfeksiyonu etkeni olan 276 GNNFB' nin 123 (%44,5)' ü *Pseudomonas*, 149 (%53,9)' u *Acinetobacter*, 3 (%1)' ü *Burkholderia cepacia complex* ve 1 (%0,3)' i de *Stenotrophomonas maltophilia* türlerine aitti.

Çalışma süresince izlenen hastaların 207 (%2,3)' sine ait kültür örneklerinde GNNFB izole edildi. Bu hastalardan 152 (%73,4)' sine klinik ve laboratuvar bulguları da değerlendirilerek GNNFB' in etken olduğu hastane enfeksiyonu tanısı kondu, diğerlerinde ise izole edilen GNNFB etken olarak değerlendirilmedi. Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşı 55,3 (min 1 max 97, SD: 26,8) olup, 84 (%55,3)' ü erkek, 68 (%44,7)' i kadındı. Çalışma süresince 62 hasta (%40,8) kaybedildi. Bunların 53' ünde (%85,4) enfeksiyonun mortaliteyi doğrudan, 9' unda da (%14,5) dolaylı etkilediği saptandı. Ortalama yaş mortalite gelişen

hastalarda 67, mortalite gelişmeyenlerde 47,3 olarak tespit edildi (p<0,001) (Tablo 4.1).

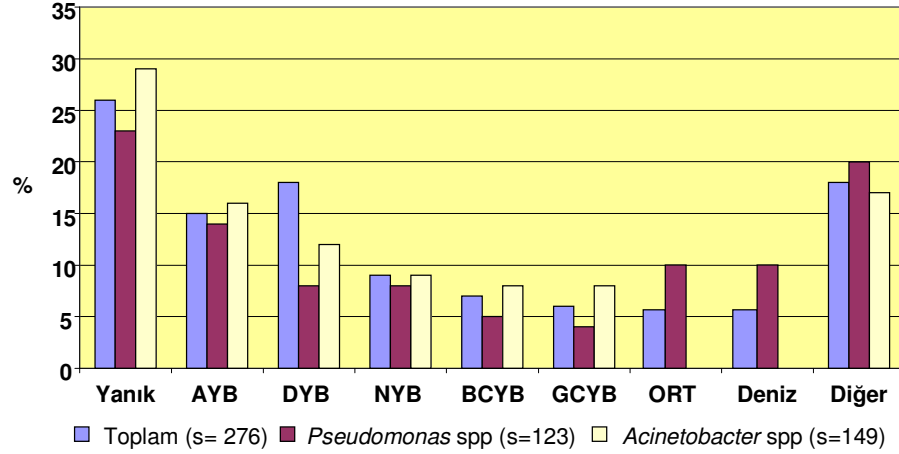
Tablo 4.1. Hastaların sűrveyans sonuçları (S=152).

Yaş (ortalama)	55,3
Kadın / Erkek (:%)	44,7 / 55,3
Yoğun Bakım / Servis (%)	68,4 / 31,6
Enfeksiyon gelişim günü (ortalama)	15,8
Yatış gün ortalaması	39,2
Santral katater kullanım oranı	0,22
Üriner katater kullanım oranı	0,4
Ventilatör kullanım oranı	0,15
Toplam aygıt kullanım oranı	0,77
Hasta yatış gün sayısı	5960
Mortalite (%)	40,7

İzole edilen GNNFB' in etken olduğu 276 enfeksiyon atağı izlendi. 76 hastada *Pseudomonas* enfeksiyonu, 74 hastada *Acinetobacter* enfeksiyonu ve birer hastada da *S.maltophilia* ve Bck enfeksiyonu gelişti.

Etkenlerin 210 tanesi (%76,9) yoğun bakım kökenli idi. *Pseudomonas* türlerinin %22,8' i (28/123) yanık servisinden, %13,8' i (17/123) anestezi yoğun bakım servisinden ve %16,2' si (20/123) dahiliye ve nöroloji yoğun bakım servislerinden (toplam %52,8, 65/123) izole edildi.

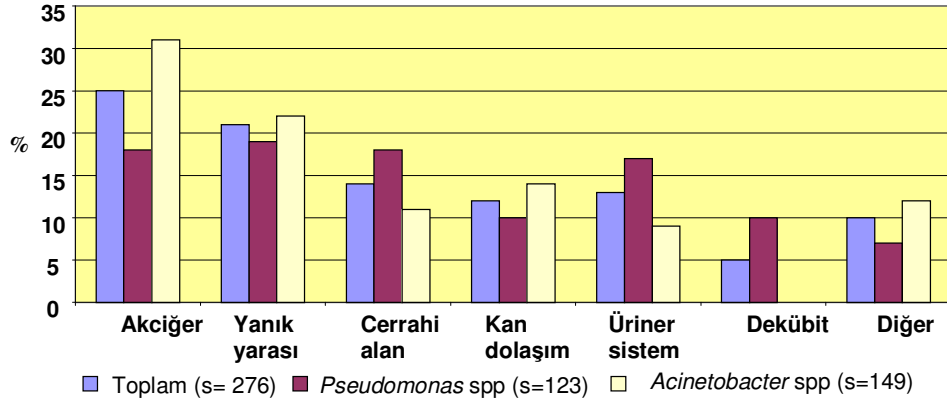
*Acinetobacter* suşlarının %29' u (43/149) yanık servisinden, %16,1' i (24/123) anestezi yoğun bakım servisinden ve %12,1' si (18/149) dahiliye yoğun bakım servislerinden (toplam %58, 85/149) izole edildi (Şekil 4.1).



AYB: Anestezi Yoğun Bakım, DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, NYB: Nöroloji Yoğun Bakım, BCYB: Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım, GCYB: Genel Cerrahi Yoğun Bakım, ORT: Ortopedi Servisi

Şekil 4.1. Etkenlerin servislere göre dağılımı.

*Pseudomonas* türleri sıklık sırasına göre %19 yanık yarası, %18 akciğer, %18 cerrahi alan ve %17 üriner sistem enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur. *Acinetobacter* türleri ise %31 akciğer, %22 yanık yarası ve %14 kan dolaşım yolu enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Etkenlerin neden olduğu hastane enfeksiyonları ve dağılımı.

*Pseudomonas* veya *Acinetobacter* türleri ile enfeksiyon gelişen hastaların, komorbid farklılıkları açısından, üriner katater, santral katater ve ventilatör kullanım oranları karşılaştırıldı. *Acinetobacter*

enfeksiyonlarına sahip hastalarda üriner katater [%85,1 ve %49,1 (p<0,001)], santral katater [%72,3 ve %29,8 (p<0,001)] ve ventilatör kullanım oranları [%57,4 ve %28,1 (p=0,002)] *Pseudomonas* enfeksiyonu gelişen hastalara oranla anlamlı derecede yüksek bulundu.

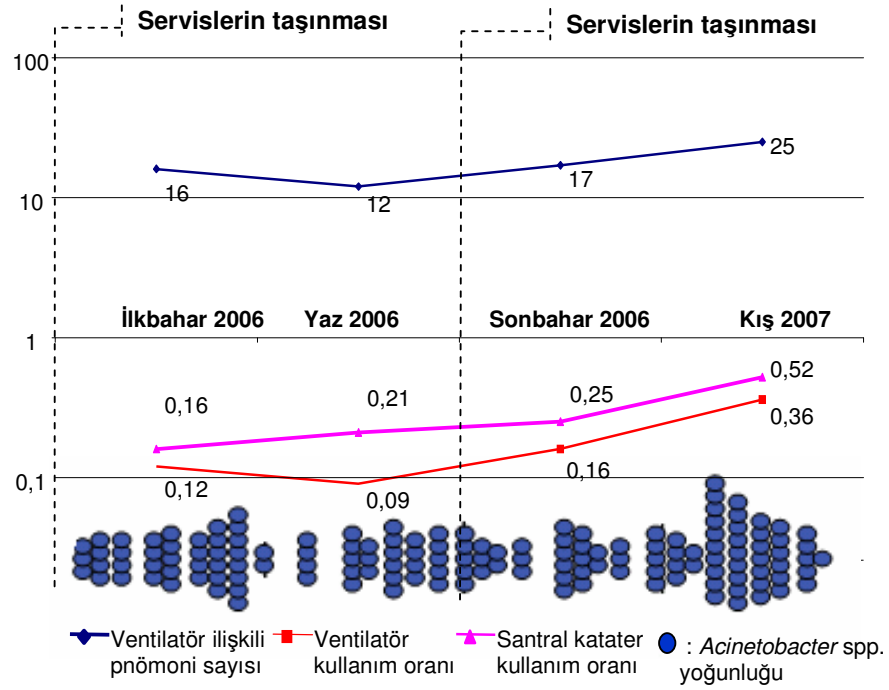
*Pseudomonas* enfeksiyonu gelişen hastalarda önceden antibiyotik kullanım oranı %69,1, *Acinetobacter* enfeksiyonu gelişen hastalarda ise %84,6 (p= 0.002) idi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Önceden antibiyotik kullanım oranları.

	İmipeneme dirençli (%)	İmipeneme duyarlı (%)	Toplam (%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	80	65,6	69,1
<i>Acinetobacter spp.</i>	86,9	80	84,6

*Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türleri ile gelişen enfeksiyonlar öncesi en çok kullanılan antibiyotik her iki grupta da sefalosporinlerdi (sırası ile %37, ve %40).

Çalışmamızda elde edilen epidemiyolojik veriler mevsimsel olarak 4 dönem halinde incelendiğinde; kış döneminde *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türleri tüm etkenler bazında %38,7 gibi bir oranla en yüksek düzeyde etken olarak karşımıza çıkmıştır. Yine aynı dönemde izole edilen *Acinetobacter* türlerinin sayısı bir önceki döneme göre iki kata yakın bir artış göstermiştir (p=0.047). Bununla beraber Şubat 2006 ayında hastanemizde servislerin yeni tamamlanan hizmet binasına taşınması işlemi gerçekleşmiş ve servislerin çoğu aynı hasta odalarını, tıbbi cihaz ve malzemeyi ortak kullanmak zorunda kalmışlardır. Eylül 2006 ayında ise yatan hasta odaları ve servislerin hizmet alanlarındaki darlığın giderilmesi amacı ile cerrahi servisler yeni hizmet binasında kalırken, dahili servisler tekrar eski hizmet binasına taşınmışlardır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Acinetobacter* spp. yoğunluğu ve diğer parametrelerin mevsimsel değişimi.

*Acinetobacter* enfeksiyonlarına ait veriler incelendiğinde, kış dönemi ventilatör kullanım oranı, santral katater kullanım oranı ve ventilatör ilişkili pnömoni sayılarının en yüksek olduğu dönem olarak saptanmıştır.

*Pseudomonas* türlerinde dahili ve cerrahi servisler arasında antibiyotik dirençleri açısından anlamlı fark saptanmadı. *Acinetobacter* türlerinde ise seftazidim (%94,9 ve %100,  $p=0,02$ ), sefepim (%79,5 ve %96,  $p=0,002$ ), siprofloksasin (%82,1 ve %95,  $p=0,015$ ), piperasilin-tazobaktam (74,4 ve %89,9,  $p=0,02$ ) ve seftriakson (%94,6 ve %100,  $p=0,027$ ) dirençleri cerrahi servislerde daha yüksek oranlarda saptandı (Tablo 4.3 ve 4.4).

Tablo 4.3. *Pseudomonas* türlerinin servislere göre direnç durumu (%).

ANTİBİYOTİK	DAHİLİ SERVİSLER				CERRAHI SERVİSLER					
	DYB S:10	NYB S:10	SERVİSLER S:20	GENEL DİRENÇ	AYB S:17	YANIK S:28	GCYB S:5	BCYB S:7	SERVİSLER S:26	GENEL DİRENÇ
<b>kinolonlar</b>										
siprofloksasin	30	40	30	32,4	23,5	46,4	10	28,6	30,7	40,3
levofloksasin	20	40	30	30	23,5	39,2	0	42,9	34,6	31,7
<b>sefolsporinler</b>										
seftriakson	60	60	30	50	58,8	85,1	80	50	69,2	68,6
sefotaksim	60	60	30	50	58,8	85,1	80	50	69,2	68,6
seftazidim	50	40	60	54,1	64,7	64,2	60	68,8	61,5	65,4
sefepim	40	40	35	37,8	35,2	50	60	57,1	30,7	41,9
<b>aminoglikozitler</b>										
gentamisin	30	50	25	35	41,1	32,1	20	42,9	46,1	36,4
amikasin	10	10	5	5,6	23,5	3,5	10	0	11,1	7,9
netilmisin	20	20	20	20	41,1	25	20	42,9	26,9	29,2
<b>karbapenemler</b>										
meropenem	10	40	25	22,5	41,2	32,1	0	14,3	19,2	26,5
imipenem	10	50	15	22,5	47,1	32,1	0	28,6	7,6	25,3
<b>diğerleri</b>										
<b>piperasilin-tazobaktam</b>	30	20	30	25	41,1	53,5	60	42,8	19,2	36,1
<b>aztreonam</b>	50	30	50	45,7	52,9	64,2	60	28,6	42,3	50
<b>tobramisin</b>	30	20	10	18,9	17,6	32,1	0	42,9	19,2	27
<b>karbenisilin</b>	50	60	65	61,8	58,8	85,7	80	71,4	57,6	69,7
<b>sefoperazon-sulbaktam</b>	20	40	30	35,3	52,9	50	60	71,4	19,2	42

DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, NYB: Nöroloji Yoğun Bakım, AYB: Anestezi Yoğun Bakım, GCYB: Genel cerrahi Yoğun bakım, BCYB, Beyin Cerrahi Yoğun bakım

Tablo 4.4. *Acinetobacter* türlerinin servislere göre direnç dağılımı (%).

ANTİBİYOTİK	DAHİLİ SERVİSLER				CERRAHI SERVİSLER						
	DYB S:18	NYB S:14	SERVİSLER S:12	GENEL DİRENÇ	AYB S:24	YANIK S:43	GCYB S:12	BCYB S:12	KDCYB S:5	SERVİSLER S:9	GENEL DİRENÇ
<b>kinolonlar</b>											
siprofloksasin	81,3	92,3	83,3	82,1	95,8	100	83,3	83,3	100	100	95
levofloksasin	68,8	30,8	41	48,7	45,8	27,8	27,3	36,4	60	22,2	33,7
<b>sefalosporinler</b>											
seftriakson	100	91,7	91,6	94,6	100	100	100	100	100	100	100
sefotaksim	93,8	91,7	91,6	92,1	95,8	100	100	100	100	11,1	97,9
seftazidim	93,8	100	91,6	94,9	100	100	100	100	100	100	100
sefepim	87,5	76,9	75	79,5	95,8	97,6	91,6	91,7	100	100	96
<b>aminoglikozit</b>											
gentamisin	68,8	84,6	60	71,1	91,7	80	90,9	54,5	80	83,3	80
amikasin	81,3	69,2	50	69,2	91,7	81,6	81,8	83,3	60	55,5	80,6
netilmisin	27,7	35,7	25	29,5	29,1	27,9	33,3	16,6	0	22,2	25,6
<b>karbapenemler</b>											
meropenem	66,7	85,7	50	68,9	70,8	86	58,3	50	60	44,4	70,5
imipenem	66,7	78,6	50	65,9	70,8	83,7	58,3	41,7	20	44,4	66,7
<b>piperasilin- tazobaktam</b>	81,3	76,9	58,3	74,4	87,5	100	83,3	83,3	60	88,8	89,9
<b>ampisilin- sulbaktam</b>	68,8	41,7	75	60,5	54,2	59	63,6	72,7	80	57,1	60,2
<b>doksisiklin</b>	43,8	16,7	33,3	31,6	12,5	33,3	18,2	50	60	11,1	28,3
<b>tobramisin</b>	43,8	61,5	66,6	53,8	66,7	55,8	58,3	25	0	11,1	49
<b>minosiklin</b>	14,3	0	8	10	8,3	9,3	25	25	0	11,1	9,1
<b>sefoperazon- sulbaktam</b>	35,7	27,3	25	33,3	45,8	53,4	41,6	50	60	22,2	48,2

DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, NYB: Nöroloji Yoğun Bakım, AYB: Anestezi Yoğun Bakım,

GCYB: Genel cerrahi Yoğun bakım, BCYB, Beyin Cerrahi Yoğun bakım

Çalışmamızda, hastalarda imipenem dirençli etkenlerle enfeksiyon gelişimi açısından, 1) başka bir hastaneden hastanemize nakil olma, 2) yoğun bakımda yatıyor olma, 3) yanık, 4) önceden antibiyotik kullanımı, 5) önceden üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı, 6) önceden karbapenem kullanımı, 7) üriner katater kullanılması, 8) santral katater kullanılması ve 9) ventilatör kullanılması anlamlı risk faktörleri olarak tanımlandı. Yoğun bakımda yatıyor olmak (OR: 0,23), yanık (OR: 0,48) ve önceden karbapenem kullanımı (OR: 0,29) ise bağımsız risk faktörleri olarak saptandı (p<0,05) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. İmipeneme dirençli etkenlerle enfeksiyon gelişimi açısından risk faktörleri.

Risk Faktörü	İmipenem dirençli (n=131)	İmipenem duyarlı (n=145)	p, (OR,CI%95)
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın	49	69	*
Erkek	82	76	
<b>Nakil</b>			
Yok	71	101	0,008, (0,51, 0,31–
Var	60	44	0,84)
<b>Yoğun Bakım***</b>			
Yok	13	52	0,000, (0,19, 0,1–
Var	118	93	0,38)
<b>Yanık***</b>			
Yok	85	119	0,001, (0,4, 0,23–
Var	46	26	0,7)
<b>Komorbidite</b>			
Yok	58	50	*
Var	73	95	
<b>Servisler</b>			
Dahili	38	47	*
Cerrahi	93	98	
<b>Yaş</b>			
< 60	78	83	*
≥ 60	53	62	
<b>İnfeksiyon günü</b>	16	13	*
<b>Yatış süresi</b>	47	39	*
<b>Yaş</b>	52	53	*
<b>Önceden antibiyotik kullanımı**</b>			
Yok	19	42	0,004, (0,41, 0,22–
Var	112	103	0,76)
<b>3. kuşak Sefalosporin</b>			
Yok	64	107	0,000, (0,33, 0,2–
Var	67	38	0,56)

Tablo 4.5. (devamı)

Risk Faktörü	İmipenem dirençli (n=131)	imipenem duyarlı (n=145)	p, (OR,CI%95)
<b>Karbapenem*</b>			
<b>**</b>			
Yok	88	124	0,000, (0,34, 0,19- 0,62)
Var	43	21	
<b>İnvaziv aygıt kullanımı</b>			
<b>Üriner katater</b>			
Yok	28	55	0,003, (0,44, 0,26- 0,76)
Var	103	90	
<b>Santral katater</b>			
Yok	50	76	0,018, (0,56, 0,34- 0,9)
Var	81	69	
<b>Ventilatör uygulaması</b>			
Yok	61	94	0,002, (0,46, 0,28- 0,75)
Var	70	50	

\*: p&gt;0,05

\*\*: Kinolon, ampisilin-sulbaktam ve aminoglikozit kullanımı ile imipenem direnci arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır

\*\*\*: Bağımsız risk faktörleri

Bağımsız risk faktörleri ile imipenem dirençli enfeksiyon gelişimi arasında en kuvvetli ilişki yoğun bakımda yatıyor olmak parametresinde saptandı (p< 0,001, değer: -0,359).

İmipenem direnci, disk difüzyon yöntemi ile *Acinetobacter* suşlarında *Pseudomonas* suşlarına göre irdelendiğinde, *Pseudomonas* suşlarında imipenem direnci %24,4, *Acinetobacter* suşlarında ise %66,4 idi. İki grup arasındaki imipenem direnç yüzdeleri farkı anlamlı idi (p<0.001) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında imipenem için disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerinin sonuçları.

	<i>Pseudomonas</i> spp. n=123 (%)			<i>Acinetobacter</i> spp. n=149 (%)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Disk difüzyon	75,6	(---)	24,4	33,6	(---)	66,4
Mikrodilüsyon	72	4	24	30	9	61

*Acinetobacter* suşlarında MİK düzeylerinin ventilatör kullanımı ile ilişkisi incelendiğinde, ventilatör kullanılan ve kullanılmayan hastalar arasında anlamlı fark yoktu. Buna karşın imipenem MİK değeri  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  (duyarlı) olan *Pseudomonas* suşlarının oranı ventilatör kullanılan grupta %56,4 ve ventilatör kullanılmayan grupta %79,5 olarak saptandı (p=0,039).

*Acinetobacter* suşlarında imipenem MİK düzeyleri ile yoğun bakım ilişkisi incelendiğinde, imipenem MİK değeri  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  (dirençli) olan *Acinetobacter* suşlarının yoğun bakımda yatan hastalarda oranı %67 iken servislerde yatan hastalarda %36,8 olarak saptandı (p=0,013, OR: 3,48 CI%95 1,25-9,69). *Pseudomonas* suşlarında ise oranlar sırası ile %26,5 ve %7,1 olarak saptandı (p=0,012, OR: 4,68 CI%95 1,28–17,03).

*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerine bağlı enfeksiyonlar ile hastaların 30 günlük mortalite oranları karşılaştırıldığında, *Acinetobacter* türleri ile gelişen enfeksiyonlarda hastaların 30 günlük mortalite oranı (%61,7), *Pseudomonas* enfeksiyonu gelişen hastalardaki mortaliteye ((%35,1) oranla anlamlı derecede yüksek bulundu (p= 0,007, OR: 2,92 CI%95, 1,3–6,6). Buna karşın *Pseudomonas* enfeksiyonu ve *Acinetobacter* enfeksiyonu ile kaybedilen hastaların ortalama yaşları arasında bir farklılık saptanmadı [ 71,9 ve 63,4 (p=0,065)].

İmipenem direncinin hastaların 30 günlük mortalite oranlarına etkisi incelendiğinde; *Pseudomonas* türleri ile gelişen enfeksiyonlarda eğer imipenem direnci varsa 30 günlük mortalite oranı %63,6, imipenem direnci yoksa %28,3 (p=0,038) olarak saptandı. (OR: 0,225, CI95, 0,056–0,900).

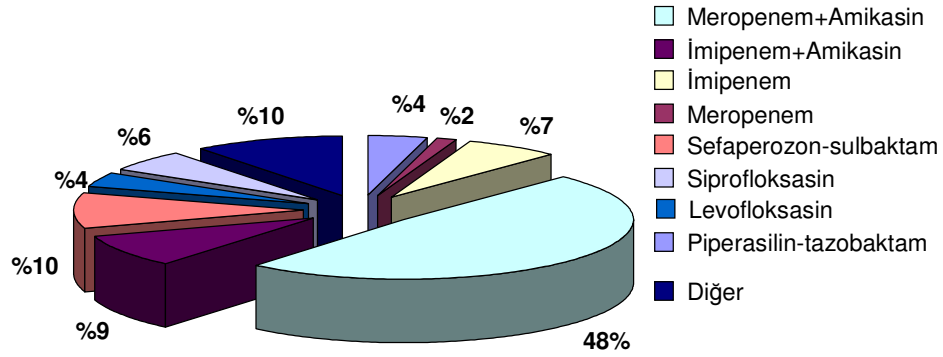
Aynı oran *Acinetobacter* türleri ile gelişen enfeksiyonlarda sırası ile %65,2 (15/23) ve %58,3 (14/24) olarak bulundu. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (p=0,627)

*Acinetobacter* suşları antibiyogram sonuçlarına göre fenotipik olarak değerlendirildiğinde ise %50,5' i benzer antibiyotik direnç özellikleri gösteriyordu (antibiyotik fenotipi: imipenem dirençli, meropenem dirençli, gentamisin dirençli, levofloksasin duyarlı, siprofloksasin dirençli, sefepim dirençli, seftriakson dirençli, piperasilim-tazobaktam dirençli, doksisisiklin

duyarlı, minosiklin duyarlı). *Pseudomonas* suşlarında ise fenotipik benzerlik %8,9 idi (antibiyotik fenotipi: karbapenemlere, kinolonlara, aminoglikozitlere duyarlı, penisilinlere ve sefaloporinlere dirençli).

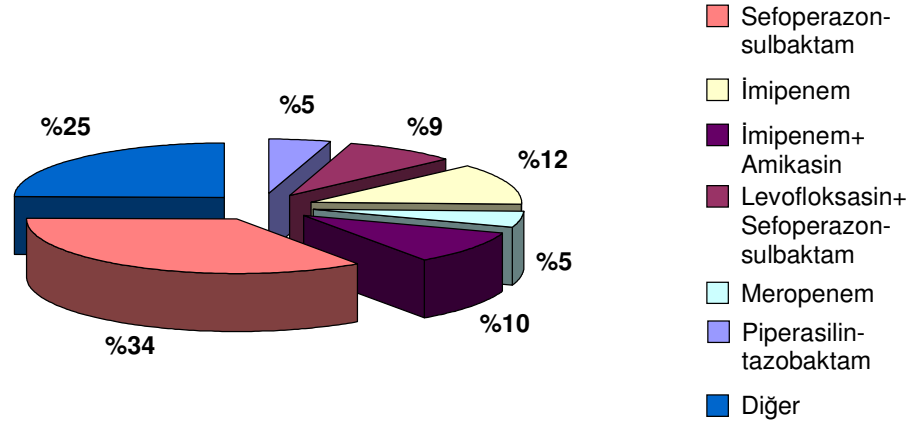
*Pseudomonas* suşlarının %6,5' inde (8/123), *Acinetobacter* suşlarının %12,5' inde (19/149) MİK değerine göre yüksek düzey imipenem direnci vardı. (MİK $\geq$  32  $\mu$ g/ml) (p<0,001).

*Pseudomonas* enfeksiyonlarında tedavide en sık tercih edilen antibiyotik karbapenem+amikasin kombinasyonuydu (%57,7, 71/123). Bunun dışında sefoperazon-sulbaktam (%9) ve imipenem (%7) monoterapide en sık kullanılan antibiyotiklerdi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında tedavide tercih edilen antibiyotiklerin dağılımı.

*Acinetobacter* enfeksiyonlarında ise tedavide en sık tercih edilen antibiyotik sefoperazon-sulbaktam oldu (%34,9, 52/149). En sık kullanılan antibiyotik kombinasyonları da imipenem-amikasin (%10) ve levofloksasin-sefoperazon-sulbaktam (%9) idi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tedavide tercih edilen antibiyotiklerin dağılımı.

*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında imipeneme direnç gelişimi açısından risk faktörleri imipenem duyarlı suşların kontrol grubu olarak değerlendirilmesi ile irdelendi. *Pseudomonas* suşlarında, imipenem direnci açısından 1) yoğun bakımda yatıyor olmak, 2) önceden 3. kuşak sefalosporin kullanımı, 3) önceden karbapenem kullanımı ve 4) ventilatör uygulaması anlamlı risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Yoğun bakımda yatıyor olmak (OR: 0,21) ve önceden karbapenem kullanımı (OR: 0,28) ise bağımsız risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Bunların içerisinde karbapenem kullanımı imipenem direnç gelişimi açısından *Pseudomonas* suşlarında istatistiksel olarak en kuvvetli ilişkiyi göstermiştir ( $p < 0,05$ , değer: 0,26,) (Tablo 4.7).

*Acinetobacter* suşlarında ise imipenem direnci açısından 1) başka hastaneden hastanemize nakil, 2) yoğun bakımda yatış, 3) yanık, 4) komorbid hastalığı (diabet, kronik böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği gibi) bulunmak, 5) önceden 3. kuşak sefalosporin ve 6) önceden karbapenem kullanımı anlamlı risk faktörleri olarak değerlendirilmiştir. Karbapenem kullanımı (OR: 0,33) tek başına bağımsız risk faktörü olarak tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.7).

Ayrıca imipeneme dirençli *Acinetobacter* suşlarının hastalarda ortalama 7. günde imipenem duyarlıların ise ortalama 16,5. günde enfeksiyona yol açtığı gözlenmiştir.

Tablo 4.7. Etkenlerde imipeneme direnç gelişimi açısından risk faktör analizi.

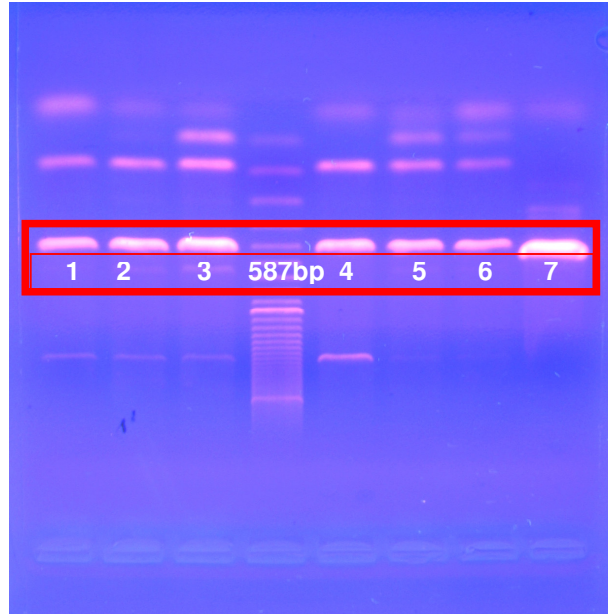
Risk Faktörü	<i>Pseudomonas</i> spp.			<i>Acinetobacter</i> spp.		
	IMP dirençli (n=30)	IMP duyarlı (n=93)	p, (OR,CI%95)	IMP dirençli (n=99)	IMP duyarlı (n=50)	p, (OR,CI%95)
<b>Cinsiyet</b>						
Kadın	16	44	*	32	24	*
Erkek	14	49		67	26	
<b>Nakil</b>						
Yok	17	61	*	53	39	0,004, (0,32, 0,14-0,7)
Var	13	32		46	11	
<b>Yoğun Bakım</b>						
Yok	4	39	0,004, (0,21, 0,06-0,66)	9	12	0,014, (0,31, 0,12-0,81)
Var	26	54		90	38	
<b>Yanık</b>						
Yok	21	74	*	63	43	0,004, (0,28, 0,11-0,69)
Var	9	19		36	7	
<b>Komorbidite</b>						
Yok	12	38	*	45	11	0,005, (2,9, 1,3-6,4)
Var	18	55		54	39	
<b>Servisler</b>						
Dahili	9	31	*	29	15	*
Cerrahi	21	62		70	35	
<b>Yaş</b>						
< 60	17	55	*	60	27	*
≥ 60	13	38		39	23	
<b>İnfeksiyon günü</b>	6	7	*	7	16,5	0,013
<b>Yatış süresi</b>	32	38	*	49	39	*
<b>Yaş</b>	51,5	51	*	52	55	*
<b>Önceden antibiyotik kullanımı**</b>						
<b>3. kuşak Sefalosporin</b>						
Yok	14	68	0,008, (0,32, 0,13-0,75)	50	37	0,006, (0,35, 0,17-0,75)
Var	16	25		49	13	
<b>Karbapenem</b>						
Yok	19	80	0,006, (0,28, 0,1-0,72)	68	42	0,045, (0,41, 0,17-0,99)
Var	11	13		31	8	
<b>İnvaziv aygıt kullanımı</b>						
<b>Üriner katater</b>						
Yok	10	46	*	18	9	*
Var	20	47		81	41	

Tablo 4.7. (devamı)

	<i>Pseudomonas</i> spp.			<i>Acinetobacter</i> spp.		
	IMP dirençli (n=30)	IMP duyarlı (n=93)	p, (OR,CI%95)	IMP dirençli (n=99)	IMP duyarlı (n=50)	p, (OR,CI%95)
<b>Santral katater</b>						
Yok	15	62	*	35	12	*
Var	15	31		64	38	
<b>Ventilatör</b>						
Yok	14	69	0,004, (0,29, 0,12-0,68)	46	23	*
Var	16	23		53	27	

IMP: İmipenem, \*:  $p > 0,05$ , \*\*: Kinolon, ampisilin-sulbaktam ve aminoglikozit kullanımı ile imipenem direnci arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

276 etkenin tamamına yapılan tarama testinde 67 etkende (29 *Pseudomonas*, 37 *Acinetobacter* suşu) metallo beta laktamaz varlığı açısından tarama testi pozitifliği tespit edilmiştir (21 tanesi imipeneme duyarlı, 46 tanesi imipeneme dirençli). Tarama testi pozitif olan etkenlerden, 6 hastadan ( 5 erkek, 1 kadın) izole edilen 7 *Pseudomonas* suşunda PZR ile blaIMP grubuna dahil MBL geni varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MBL pozitif izolatların jel elektroforez sonrası ultraviyole ışık altında görünüşleri.

Aynı hastadan izole edilen iki etken arasında geçen süre yaklaşık iki aydı. Yedi etkenden beş tanesi imipenem dirençli iken ( $MİK \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ), iki tanesi ise imipenem duyarlıydı ( $MİK \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ). İmipenem duyarlı MBL pozitif etkenlerden birisi sefoperazon-sulbaktam ile tedavi edilirken diğer tüm etkenlere karbapenem+amikasin kombinasyon tedavisi verildi. İmipenem dirençli MBL pozitif izolatlardan birisi hastanın yatışının hemen ertesi günü izole edildi. Ancak bu hasta dış merkezdeki dört günlük yatışının ardından hastanemizin yanık servisine nakledilmişti. MBL pozitif etkenlerin izolasyonundan önce hepsinde önceden antibiyotik kullanım hikayesi mevcuttu, üç MBL pozitif izolatta ise iki veya daha fazla grup antibiyotik kullanımı vardı. MBL pozitif izolatların altı tanesi yoğun bakım, bir tanesi ise servis kökenli idi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Metallo beta laktamaz geni taşıyan izolatların epidemiyolojik ve klinik özellikleri.

Hasta no	İzolat No	Servis	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Nakil	Enfeksiyon gelişim günü	İzolasyon tarihi	Örnek	Etken	MİK (µg/ml)	Enfeksiyon yeri	İnvaziv aygıt	Önceden kullanılan antibiyotik	Verilen antibiyotik	Sonuç	Ölüme katkı	Yatış süresi (gün)
1	1	NYB	erkek	53	var	44	31.07.2006	İdrar	Pseudomonas	≥ 16	Üst ÜSİ	Var	Multipl	Meropenem+ Amikasin	ex	Yok	183
2	2	ORT	kadin	80	yok	18	04.01.2007	Yara	Pseudomonas	≤ 4	CAİ-derin	Var	1.KSS	Sefoperazon-sulbaktam	sifa	yok	34
3	3	AYB	erkek	76	yok	3	07.04.2006	Balgam	Pseudomonas	≥ 16	Akciğer	Var	Meropenem	İmipenem+ Amikasin	ex	var	9
4	4	AYB	erkek	26	var	94	20.11.2006	Yara	Pseudomonas	≥ 16	Dekübit	Var	Multipl	İmipenem+ Amikasin	sifa	yok	171
	5	BCYB				155	22.01.2007	İdrar	Pseudomonas	≤ 4	Alt ÜSİ	Var	Multipl	Meropenem+ Amikasin	sifa	yok	
5	6	Yanık	erkek	51	var	1	28.08.2006	Kan	Pseudomonas	≥ 16	Yanık yarası	Var	Sefoperazon-sulbaktam	Meropenem+ Amikasin	ex	var	4
6	7	Yanık	kadin	1	var	6	22.01.2007	Doku	Pseudomonas	≥ 16	Yanık yarası	Yok	Ampisilin-sulbaktam	Meropenem+ Amikasin	sifa	yok	13

NYB: Nöroloji Yoğun Bakım Servisi, ORT: Ortopedi Servisi, AYB: Anestezi Servisi, BCYB: Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi, ÜSİ: Üriner sistem enfeksiyonu, CAİ: Cerrahi alan enfeksiyonu, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

## 5. TARTIŞMA:

Bu çalışmada 1000 yataklı bir eğitim hastanesi olarak hizmet vermekte olan hastanemizin yoğun bakım ünitelerinde hastane enfeksiyonlarının en yaygın nedeni olarak karşımıza çıkan GNNFB'lerde giderek artış gösteren çoklu antibiyotik direnci ve bu direncin epidemiyolojik özellikleri ortaya araştırılmıştır. Çalışmamız hastane ve yoğun bakım için son derece ciddi enfeksiyonlara yol açan GNNFB'lerin %34 oranında en sık izole edilen hastane enfeksiyonu etkeni olduğunu ortaya koymuştur. Diğer gram negatif bakteriler %32, gram pozitif bakteriler %25, mayalar ise yalnızca %9 oranında hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilmişlerdir.

İzole edilen suşlardan *Pseudomonas*'ların % 36,5' i, *Acinetobacter* suşlarının ise %44,9' u Anestezi Yoğun Bakım ve Yanık Servislerinden izole edilmiştir. Bu bakterilerin, diğer servislere oranla Yanık ve Anestezi Yoğun Bakım Servisi'nde daha sık bulunması, buradaki hastaların ciddi komorbid faktörlere sahip olması, daha fazla invaziv girişime maruz kalmaları ve daha uzun süreli yatarak tedavi görmelerinden kaynaklanmış olabilir.

Ayrıca *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. gibi nonfermentatif bakterilerin en önemli özelliği yoğun bakım ünitelerinin florasında yaygın olarak bulunmaları ve invaziv aletler ve hastane personeli aracılığıyla kolayca hastalar arasında transfer edilebilmeleridir. Zanetti ve ark. (122) yanık servisine kabul edilen *Acinetobacter baumannii* ile enfekte olan bir hastadan 6 ay sonra ortaya çıkan salgından ve çevre örneklerindeki yoğun *A. baumannii* izolasyonundan bahsetmekte ve bu bakterilerin yoğun bakım ünitesine girdikten sonra uzun süre hastane enfeksiyonu için tehdit oluşturduğunu öne sürmektedir. Hastanemiz bünyesinde bulunan Yanık ünitesi İstanbul bölgesinde bu tür hastalara hizmet veren tek özel merkez durumunda olup, çoğu kez çevre hastane ve yoğun bakım ünitelerinden hasta kabul etmektedir. Bu da özellikle yanık servisinde dirençli bakterilerin daha yaygın görülmesine ve daha ciddi enfeksiyonlarla karşılaşılmasına neden olmaktadır.

Çalışmamızda izole edilen bakterilerin mevsimsel ilişkisi incelendiğinde özellikle kış döneminde *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının daha fazla oranda izole edildikleri dikkati çekmektedir. Şubat 2006 ayında hastanemizdeki servislerin hemen hepsi daha dar bir alana sahip olan yeni hizmet binasına nakledilmişlerdir. Bunun sonucunda değişik servislerin hastaları aynı odalarda yatmış, servislerin bazı tıbbi cihaz ve malzemeleri (özellikle pansuman setleri ve mekanik ventilasyon cihazları) ortak kullandıkları gözlemlenmiştir. Bu durum enfeksiyon kontrol önlemlerindeki aksamaları da beraberinde getirmiş, zaten hastane ortamına son derece dirençli olan GNNFB' in tıbbi cihaz ve malzemeler yolu ile hastalar arasında yayılımı gerçekleşmiş olabilir (Bkz. Şekil 4.3).

Irequi ve ark. (53) özellikle ventilatörle ilişkili pnömonide erken başlanan tedavinin hayat kurtarıcı olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda uygulanan aktif sürveyansın bir sonucu olarak enfeksiyon geliştiği düşünülen olgularda ilk 24 saat içinde ampirik ya da preemtif tedavi başlandı. Antibiyotik seçiminde, hastanemizin önceki yıllara ait sürveyans sonuçları ile güncel tedavi rehberleri dikkate alındı (18). *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinde en sık karbapenem ve amikasin kombinasyon tedavisi (%57,7), *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde ise en sık sefaperazon-sulbaktam (%34) kullanıldı. Çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda ise genellikle yüksek doz kombinasyon tedavileri kullanıldı (örn. levofloksasin 750 mg ve sefaperazon-sulbaktam 4-6 gr kombinasyonu (%9) veya karbapenem ve netilmisin (%5) kombinasyonu gibi). Bununla beraber çalışmamıza dahil edilen hasta grubunda mortalite istenilen düzeyde değildi (%40,7).

*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında antibiyotik direnç gelişimi için en önemli risk faktörlerinden birisi de önceden antibiyotik kullanımınıdır. Bu konuda Georges (123), Tomas (124) ve Brahmi (125) önceden antibiyotik kullanımının direnç gelişimine olan katkısını araştırmış ve anlamlı ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* enfeksiyonlarından önce antibiyotik kullanım oranlarımız

sırası ile %69,1 ve %84,6 olarak bulunmuştur. Özellikle sefalosporin ve karbapenem kullanımının *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında antibiyotik direnç gelişiminde önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (124, 126-128). Hastanemizde önceden antibiyotik kullanımında sefalosporinlerin sıkça tercih edilmesi, *Acinetobacter* suşlarında saptanan yüksek sefalosporin direncinden (%98,4) sorumlu olabilir.

Çalışmamızda *Acinetobacter* suşlarındaki imipenem direnci (%66,4) yurtiçi ve yurtdışında yapılan benzer çalışmaların çoğundan daha yüksek bulunmuştur (30, 33, 34, 38, 76, 77, 79). Bunun dışında çalışmamızdaki *Acinetobacter* suşlarında imipenem direnç oranları 2003 yılında hastanemizden bildirilen %23' lük direnç oranlarıyla karşılaştırıldığında %43,4' lük bir artış dikkati çekmektedir (41). Bu artış aynı süreçte karşılaşılan *Acinetobacter* enfeksiyon sayısı ile de ilişki göstermektedir. Hastanemizde 2003 yılında gözlenen tüm enfeksiyonların %15,48' i, çalışma dönemimizde ise %18,5' inin *Acinetobacter* kaynaklı olduğu gözlenmiştir. *Acinetobacter* enfeksiyonlarında direnç artışı açısından en sık sorumlu tutulan risk faktörlerinin başında yoğun antibiyotik kullanımı gelmektedir (124, 128). *Acinetobacter* suşlarında gözlenen imipenem gibi birçok antibiyotiğe karşı görülen direnç oranlarındaki bu artış, özellikle son yıllarda daha ciddi boyutta geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, daha ciddi hastaların merkezimiz tarafından takip edilmesi ve daha fazla *Acinetobacter* enfeksiyonlu hasta ile karşılaşılmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda *Acinetobacter* suşlarındaki seftazidim direnç oranı ülkemizden yapılan diğer çalışmalardan (30, 76, 77) ve İspanya verilerinden (35) düşük iken Amerika Birleşik Devletleri (34) ve Avrupa (36) verilerinden daha yüksek bulunmuştur. 2003 yılındaki direnç oranımıza göre ise %3,3 oranında bir azalma saptanmıştır (41). *Acinetobacter* enfeksiyonlarında genel olarak seftazidime karşı üç yıllık dönemde görülen duyarlılık artışı, bu antibakteriyel ajanın genel olarak

hastane enfeksiyonlarının tedavisinde son yıllarda tercih edilmemesi ve kullanılmamasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda *Acinetobacter* suşlarındaki aminoglikozit direnç oranı da imipenem direnci gibi yurtiçi ve yurtdışında yapılan çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur (30, 33, 34, 38, 76, 77, 79). Bununla birlikte 2003 yılındaki direnç oranımıza göre %13,7 oranında bir artış izlenmiştir (41). *Acinetobacter* suşlarında gözlenen kinolon direnç oranlarımız da aminoglikozit grubunda olduğu gibi Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa verilerinden daha yüksek olarak saptanmıştır (32). Son üç yıllık verilerle karşılaştırıldığında hastanemizde görülen *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kinolon direncinin %41,4 oranında artışı dikkat çekmiştir. Bu durum *Acinetobacter* suşlarının *Pseudomonas* suşları gibi antibakteriyel direnç gelişiminde birden fazla mekanizmayı kullanabilmesi, bir antibiyotiğe karşı direnç gelişimi esnasında hiç kullanılmayan antibiyotiklere karşı da eş zamanlı dirence sahip olmasından kaynaklanabilir (129).

Genel olarak, *Acinetobacter* suşlarında hastanemizin direnç oranları ürkütücü boyutlardadır. Hastanemizde, yoğun hastane enfeksiyonları sürveyansına rağmen *Acinetobacter* suşlarında yıllar içerisinde direnç oranlarında dramatik artışlar gözlenmektedir. Bu durum son yıllarda daha fazla *Acinetobacter* enfeksiyonları ile karşılaşmış olması, bu bakterilerin yoğun bakım ve hastanemizin florasında kalıcı hale gelmiş olması ve kolayca hastalar arasında transfer edilmiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Hastalar arasında *Acinetobacter* türlerinin transferinden, özellikle yoğun hasta trafiği esnasında portatif mekanik ventilatör gibi çeşitli ekipmanların kullanımı sonucunda asepsi ve antisepsi uygulamalarında ve temas önlemlerinin uygulanması konularında yaşanan aksaklıklar sorumlu olabilir.

Armour ve ark. (130) yanık ünitelerinde yaptıkları bir çalışmada dirençli *Pseudomonas* enfeksiyonu gelişen hastalarda verilen tedavinin kontrol grubuna göre mortaliteyi değiştirmediyini (sırası ile %44 ve %8), ortaya koymuşlardır. Trottier ve ark. (131) ise travma yoğun bakım ünitesinde yoğun karbapenem kullanımı sonrası *Acinetobacter* suşlarında

imipenem direncinin %87 olarak tespit edildiğini ifade etmekte ve çevre dekontaminasyonun ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin gerekliliğini vurgulamaktadırlar. Çalışmamızdaki yüksek mortalite oranı (%40,7) ve *Acinetobacter* suşlarındaki yüksek antibiyotik direnç oranları göz önüne alındığında, enfeksiyon gelişiminden önce kolonizasyonun engellenmesi, sıkı temas önlemleri ve diğer nedenlerle antibiyotik kullanımının azaltılmasının enfeksiyon kontrolünde en etkili yöntemler olacağı değerlendirilmiştir (130).

Çalışmamızda *Pseudomonas* suşlarının etken olduğu hastane enfeksiyonlarının oranında 2003 yılına göre %0,6 oranında bir azalma saptanmıştır (sırası ile %15,2 ve %15,8).

*Pseudomonas* suşlarındaki antibiyotik direnç oranlarının değişimine bakıldığında imipenem, aminoglikozit ve kinolon dirençleri hastanemizde, Ardıç ve ark.'nın (41) yaptığı çalışmaya göre, son üç yılda %4,6-%7,5 arasında gerileme göstermiştir. Bu durum izolasyon oranlarındaki %0,6 oranındaki düşüşü açıklayabilir.

*Pseudomonas* suşlarıyla gelişen enfeksiyonların tedavisinde son yıllarda seftazidim tercih edilmemesine karşın direnç oranlarında son üç yıl içerisinde %21,7 düzeyinde bir artış göstermiştir. Bunun *Pseudomonas* suşlarında yaygın olarak görülen GSBL üretiminden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir. *Pseudomonas* suşları da *Acinetobacter* suşları gibi bünyesinde bulunan potansiyel çoklu direnç mekanizmalarını harekete geçirmeleri sonucu hiç karşılaşmadıkları antibiyotiklere karşı dirençli olarak karşımıza çıkabilmektedir (129). Mesaros ve ark. tarafından (18) seftazidim direncinde rol oynayan ana mekanizmalar a) GSBL, b) sefalosporinaz aşırı üretimi ve c) MBL enzim varlığı olarak tanımlanmıştır. Sefalosporinaz aşırı üretimi durumunda sefepime duyarlı veya orta duyarlı, MBL varlığında ise bütün  $\beta$ -laktam antibiyotiklere (aztreonam hariç) dirençli bir fenotip beklenmektedir (18). Fenotipik olarak incelendiğinde (karbapenemlere, kinolonlara ve aminoglikozitlere duyarlı, penisilinlere, sefepime ve seftazidime dirençli) çalışmamızda *Pseudomonas* suşlarının % 8,9 oranında benzer fenotipik özellik taşıdığı görülmüştür. Bu suşların

hiçbirisinde araştırılan MBL genleri saptanamamıştır. Dolayısı ile seftazidim molekülüne dirençten GSBL üretiminin sorumlu olduğu değerlendirilmiştir. Seftazidim molekülünün hiç tercih edilmemesine rağmen bu moleküle karşı direnç artışının gözlenmesi diğer sefalosporinlerin yaygın kullanımı ile açıklanabilir. Bu da gerekli önlemlerin alınmaması durumunda nakil edilebilir plazmid kaynaklı direnç aktarımı nedeni ile sonraki yıllarda hastanemizdeki direnç sorunun ciddi boyutlara ulaşabileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda izole edilen *Pseudomonas* suşlarının %8,9' nda, *Acinetobacter* suşlarının ise %50,5' inde gözlemlenen antibiyogram fenotip benzerliği bulunmuştur. Moleküler tekniklerle klonal dağılım gösterdiği saptanan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında antibiyogram fenotipinin de benzer olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (13, 132-134). Bu çalışmalarda klonal dağılım gösteren *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında %95,7-%100 arasında antibiyogram benzerliği bildirilmiştir. Dolayısı ile çalışmamızda antibiyogram fenotipi benzer olan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşları da klonal dağılım gösteriyor olabilir. Eğer çalışmamızda ortaya konan antibiyogram fenotip benzerliği, klonal dağılım olarak değerlendirilecek olursa, *Pseudomonas* suşlarında görülen klonal dağılım (%8,9) *Acinetobacter* suşlarına oranla (%50,5) daha düşük düzeyde saptanmıştır. Yanık ve Anestezi Yoğun Bakım Servisleri' nde izole edilen çoklu antibiotik dirençli *Acinetobacter* suşlarında antibiyogram fenotip benzerliği sırası ile %77,1 (27/35) ve %82,3 (14/17) olarak saptanmıştır. Bu durum özellikle *Acinetobacter* suşlarının klonal dağılım açısından merkezimizde ciddi bir tehdit oluşturduğunu, bu konuda daha fazla önlem alınması ve moleküler düzeyde doğrulama yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda *Pseudomonas* suşlarında imipenem direnci %24,4 olarak saptanmış olup, *Pseudomonas* enfeksiyonlarında karbapenemlerin halen etkin bir tedavi seçeneği olduğu değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem direnci %52,6-%15 arasında bildirilmektedir (30, 32, 33, 37, 38). Bu çalışmalarla

karşılaştırıldığında hastanemizdeki imipeneme dirençli *Pseudomonas* izolat oranları, Fidan ve ark. (37) tarafından bildirilen oran (%15) dışında, diğerlerinden daha düşüktür. Bu farklılık Fidan ve ark.'nın uygulamış oldukları enfeksiyon kontrol yöntemleri ve antibiyotik kullanım politikalarından kaynaklanmış olabilir. *Pseudomonas* suşlarındaki imipenem direnç oranımız (%24,4) ABD' deki %15 direnç oranına göre daha yüksek olarak saptanmıştır (39). Gelişmiş ülkelerde *Pseudomonas* enfeksiyonlarının daha az sayıda görülmesi ve bu tür enfeksiyonlarla daha etkin mücadelenin yapıldığı bilinmektedir. Çoğu kez dirençli bakterilerin neden olduğu tek klondan kaynaklanan küçük epidemiler esnasında bu tür dirençli izolatlarla karşılaşmakta ve daha etkin enfeksiyon kontrol yöntemleri uygulanmaktadır (116, 122, 135).

Hastane enfeksiyonları ile mücadeledeki amaçlardan biri de hastaların dirençli mikroorganizmalarla enfekte olmalarını önlemektir (130). Bu amaca yönelik dirençli mikroorganizmalarla enfeksiyon gelişimi için risk faktörlerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Akıncı ve ark. (136) tarafından yapılan bir çalışmada imipeneme dirençli gram negatif bakteri enfeksiyonları için yoğun bakımda yatıyor olmak ve önceden karbapenem kullanımının bağımsız risk faktörleri olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde yoğun bakım ünitesinde yatıyor olmak ve önceden karbapenem kullanımı imipeneme dirençli GNNFB' le enfeksiyon gelişimi açısından bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır. Bunun dışında çalışmamızda yanık ünitesinde yatıyor olmak da bağımsız risk faktörü olarak tayin edilmiştir. Bu sonuçlar, özellikle ülkemiz açısından altta tanımlanmış risk faktörleri bulunan ciddi hastalarda gelişecek enfeksiyonlarda imipeneme dirençli GNNFB' in etken olabileceğini ve bu durumun tedavi seçiminde dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda MİK değerlerine göre yüksek düzey imipenem direnci (MİK $\geq$ 32  $\mu$ g/ml) *Pseudomonas* suşlarında %6,5, *Acinetobacter* suşlarında ise %13 olarak saptanmıştır. GNNFB' de yüksek düzey karbapenem direnci sıklıkla birden fazla direnç mekanizmasının kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. Maniati ve ark. *Pseudomonas*

türlerinde yüksek düzey karbapenem direncinde birçok direnç mekanizmasının (MBL, eflüks sistemi ve porin kaybı gibi) bir arada rol oynadığını göstermişlerdir (137). Lister ve ark. (138) ise MexXY aşırı üretimi ve OprD kaybı gibi permeabilite değişikliklerinin *Pseudomonas* suşlarında yüksek düzey imipenem direncine yol açtığını ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda yüksek düzey imipenem direnci gösteren *Pseudomonas* suşlarının hiçbirisinde MBL varlığı gösterilememiştir. Dolayısı ile çalışmamızdaki *Pseudomonas* suşlarında yüksek düzey imipenem direncine neden olan mekanizmanın MBL enzim aktivitesi yerine, öncelikle permeabilite değişikliklerinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir.

*Acinetobacter* türlerindeki yüksek düzey imipenem direnci irdelendiğinde, Lolans ve ark. (139) ile Bertini ve ark. (140) tarafından bu suşlarda OXA tipi karbapenemaz varlığı gösterilmiştir. Bou ve ark. (141) *Acinetobacter* türlerinde yüksek düzey karbapenem direncinin sadece karbapenemazlara bağlı olmayıp, permeabilite değişikliğinin de direnç gelişiminde etkili olabileceğini ifade etmiştir. Çalışmamızda yüksek düzey imipenem direnci gösteren izolatların hiç birisinde MBL varlığı gösterilememesi nedeni ile bu tip dirence sebep olan direnç mekanizmalarının oksasilinaz üretimi ve / veya permeabilite değişikliğinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Vahaboğlu ve ark. (142) seftazidime dirençli *Acinetobacter* suşlarında karbapenemaz aktivitesi olan OXA-51 enzim sıklığını %77,8 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucuna göre hastanemizde de karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazları salgılayan *Acinetobacter* suşları olabileceği ve bu tip suşların araştırılmasına yönelik çalışmaların planlanması gerektiği değerlendirilmiştir.

*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının geliştirdikleri direnç mekanizmaları ana hatları ile benzer olmakla beraber, moleküler düzeyde farklılık göstermektedir. Bu nedenle iki mikroorganizmada imipeneme direnç gelişimi açısından risk faktörleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas* türlerinde imipenem direnç gelişimi için risk faktörlerini araştıran Fortaleza ve ark. (127) tarafından yapılan benzer bir çalışmada başka hastaneden nakil olma ve önceden karbapenem kullanımı bağımsız risk faktörleri olarak saptanmıştır. Çalışmamızda benzer şekilde önceden karbapenem kullanımı ve yoğun bakımda yatıyor olmanın bağımsız risk faktörleri olduğu, bunun dışında ventilatör kullanımı ve önceden 3. kuşak sefalosporin kullanımının da direnç gelişimi açısından etkili oldukları gösterilmiştir. Çalışmamız, bu alanda yapılmış benzer iki çalışmadan daha fazla risk faktörünü irdelemiştir (126, 127). Çalışmamızda bağımsız bir risk faktörü olarak ortaya konan “yoğun bakımda yatıyor olmak” parametresi Fortaleza ve ark. tarafından anlamlı değerlendirilmemekle beraber ( $p>0,05$ ), aynı çalışmacılar tarafından bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanan “başka hastaneden nakil olma” parametresi de çalışmamızda anlamlı bir risk faktörü olarak değerlendirilmemiştir ( $p>0,05$ ). Çalışmamızdaki bu farklılıklar da ortaya koymuştur ki, *Pseudomonas* türlerinde imipenem direnci açısından risk faktörleri merkezden merkeze değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle her merkezin kendisine ait risk faktörlerine göre direnç gelişimini önleyecek stratejiler geliştirmesinin daha etkin olacağı değerlendirilmiştir. Hastanemizde özellikle yoğun bakıma hasta kabulünde seçici davranılması, endikasyon dışı hastaların yoğun bakımda tutulmaması ve karbapenem kullanım oranlarının azaltılmasının *Pseudomonas* türlerinde imipenem direnç gelişimini azaltıcı etkisi olabileceği değerlendirilmiştir.

*Acinetobacter* türlerinde de aynı parametreler kullanılarak imipenem direnç gelişimi açısından risk analizi yapılmıştır. Baran ve ark. (128) ile Tomas ve ark. (124) tarafından yapılan iki çalışma, çalışmamızla yöntem olarak benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda başka hastaneden hastanemize nakil, yoğun bakımda yatıyor olmak, yanık, eşlik eden komorbidite (diabet, kronik böbrek yetmezliği, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği gibi) mekanik ventilasyon ve yatıştan enfeksiyon gelişinceye kadar geçen süre (enfeksiyon günü) imipenem

direnci için anlamlı risk faktörleri olarak değerlendirildi. Bu risk faktörleri içerisinde sadece önceden karbapenem kullanımı (OR: 2,39) bağımsız risk faktörü olarak gösterildi ( $p<0,05$ ). Tomas ve ark. çalışmasında da benzer şekilde karbapenem kullanımı bağımsız risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Burada da çalışmalarda tanımlanan risk faktörleri arasındaki farklılığın çalışılan popülasyonun ve merkezin farklı olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

*Acinetobacter* suşlarında direnç gelişimi ile enfeksiyon gelişim günü arasındaki ilişkiyi irdeleyen diğer çalışmalarda hastanede yatış günü ile imipenem dirençli enfeksiyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır (124, 128, 136). Ancak bizim çalışmamızda imipeneme dirençli *Acinetobacter* suşlarının daha erken (7. gün) enfeksiyona yol açtığı ortaya konmuştur. Çalışmamızda, *Acinetobacter* suşlarında hastaneye yatışın erken dönemlerinde daha fazla oranda invaziv aygıt kullanıldığı, imipeneme dirençli olanlarda %50,5 oranında benzer antibiyotik direnç fenotipi olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, imipeneme dirençli *Acinetobacter* suşlarının hastanemizin kalıcı florasında yerleştiğini ve invaziv aygıt kullanımları esnasında da hastalarda kolonize olarak kolayca aktarılabildiğini düşündürmektedir. Aygün ve ark. (143) tarafından yapılan bir çalışmada karbapeneme dirençli bir *Acinetobacter baumannii* türünün hastane florası ve hastane enfeksiyonu gelişen 12 yoğun bakım hastasından izole edildiği ve çevresel kontaminasyonun *Acinetobacter* enfeksiyonları açısından önemli bir zemin oluşturduğu vurgulanmıştır. Bir diğer çalışmada ise *Acinetobacter* suşlarının kuru yüzeylerde dahi üç gün ile beş ay arasında canlı kalabildiği gösterilmiştir (144).

Çalışmamızda *Acinetobacter* enfeksiyonlarında *Pseudomonas* enfeksiyonlarına göre hastaların 30 günlük mortalite oranları daha yüksek bulunmuştur (sırası ile %61,7 ve %35,1,  $p=0,007$ ). *Pseudomonas* enfeksiyonlarında imipeneme dirençli enfeksiyon gelişen hastalarda mortalite daha yüksek iken (%63,6 ve %28,3,  $p=0,038$ ) *Acinetobacter* enfeksiyonlarında imipenem direncinin 30 günlük mortaliteye etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (%65,2 ve %58,3,  $p=0,627$ ).

*Acinetobacter* enfeksiyonlarında, *Pseudomonas* enfeksiyonlarına göre hastaların invaziv aygıt kullanım oranlarının daha yüksek olması ve hastaların daha fazla komorbid faktörlere sahip olması *Acinetobacter* enfeksiyonlarının genel olarak daha mortal seyretmesini açıklayabilir. Bununla birlikte konu ile ilgili daha kapsamlı hasta sayıları ile yapılacak olan çalışmalar ışığında, *Acinetobacter* enfeksiyonlarının epidemiyolojik özellikleri daha fazla aydınlatılabilecektir. .

GNNFB' de dünya çapında giderek artan oranda MBL varlığı bildirilmektedir. Ancak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de MBL prevalansının düzenli sürveyansı yapılmamaktadır. Çalışmamız ülkemizde, 13 aylık bir dönemde düzenli olarak MBL varlığının araştırıldığı ve imipenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas* suşlarında IMP tipi MBL geni varlığını ortaya koyan bu alandaki ilk çalışmadır.

Ülkemizde bu alanda yapılan diğer epidemiyolojik çalışmalarda Fidan ve ark. (37) iki tarama testini kombine (modifiye Hodge ve çift disk sinerji) ederek *Pseudomonas* türlerinde %5 MBL pozitifliği bildirirken, Toraman ve ark. (145) yine tarama testi ile *Pseudomonas* türlerinde %29, *Acinetobacter* türlerinde ise %21 MBL pozitifliği bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da sadece imipeneme dirençli izolatlar taranmıştır.

Çalışmamızda ise, tarama testi ile, *Pseudomonas* türlerinde %23,5 (29/123, 16 imipenem dirençli, 13 imipenem duyarlı), *Acinetobacter* türlerinde ise %24,8 (37/149, 29 imipenem dirençli, 8 imipenem duyarlı) oranında MBL pozitifliği belirlenmiştir. Buna karşın tarama testinde MBL pozitifliği saptanan bu suşlar PZR ile MBL açısından araştırıldığında *Pseudomonas* türlerinin yalnızca 7 (%5,7)'sinde MBL gen varlığı gösterilebilmiştir. Tarama testi ile doğrulama testi arasındaki bu uyumsuzluğun Chu ve ark.'nın (110) bildirdiği gibi yöntemde kullanılan EDTA' nın başlı başına bakterisidal etkisi nedeni ile izlenen yalancı duyarlılık zon çapı artışına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Özellikle son yıllarda, EDTA temelli MBL tarama testlerin yalancı pozitiflik oranları ile ilgili giderek artan bildirimler vardır (146). Bu nedenle MBL gen varlığı açısından tarama testi sonuçları bir ölçüt olarak kabul edilmemelidir (101).

Avrupa' da MBL olumlu gram negatif bakterilerin yaygınlığı birçok ülkede gösterilmiştir (113, 118, 147). Ancak halen Avrupa' da etkin bir MBL s rveyans sistemi bulunmamaktadır (101). Bu nedenle MBL insidans ve prevelans oranları bireysel çalışmalarla sınırlı kalmaktadır. Lagatolla (147) İtalya' da *Pseudomonas* türlerinin genelinde %20, imipenem dirençli olanlarda ise %70 oranında MBL pozitifliği bildirmiş ve aynı direnç genlerinin bakteriler arasında hızla yayıldığını ifade etmiştir. İmipeneme dirençli *Pseudomonas* türlerinde MBL oranını; Migliavacca ve ark. (117) %15, Oh ve ark. (119) Uzak Doğu' da %22,3, Deplano ve ark. (118) Belçika' da %67,7 olarak bildirmişlerdir. Hastanemizde izole edilen *Pseudomonas* türlerindeki %5,7 oranındaki MBL gen pozitifliğinin yurtdışında yapılan diğer epidemiyolojik çalışma sonuçlarına göre düşük bulunmuştur. Ancak transfer edilebilir direnç genlerinin aynı bakteri ve bakteri türleri arasında hızlı yayılım potansiyelleri de göz önüne alınarak direnç artışıının hastanemiz açısından ciddi bir tehdit oluşturduğu düşünülmektedir.

İmipeneme duyarlı olduğu halde ( $MİK \leq 4 \mu g/ml$ ) MBL geni taşıyan izolatların klinik önemi halen açıklığa kavuşturulamamıştır (112). Çalışmamızda her ne kadar imipeneme duyarlı MBL olumlu *Pseudomonas* enfeksiyonlarında ( $S=2$ ) hastalar kaybedilmemişse de, bu tip enfeksiyonların klinik sonuçlarını değerlendirmek için sayımız yetersizdir. Ancak Paterson ve ark. (148) tarafından gizli GSBL genleri taşıyan mikroorganizmalarda uygulanan sefalosporin tedavilerinin olumsuz sonuçları ortaya konmuştur. Cornaglia ve ark. (101) ise MBL olumlu izolatların düşük MİK değerlerine sahip olsalar dahi karbapenem dirençli olarak bildirilmesini önermektedir. Bu nedenle gizli MBL genleri taşıyan izolatların yol açtığı hastane enfeksiyonlarında Franklin ve ark. (112) tarafından belirtildiği gibi kötü klinik sonuçların olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Ayrıca epidemiyolojik anlamda gizli MBL genlerinin taşıyan izolatların gözden kaçması sonucu merkezlerde yayılımı ve horizontal gen transferleri ile diğer hastane enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalara

MBL genlerini aktarabilmeleri söz konusudur (149). Hastanemizde gizli MBL genlerinin saptanmış olması, hastanemizin de bu riski taşıdığını ve GNNFB' de genetik olarak MBL gen varlığının araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda MBL olumlu *Pseudomonas* enfeksiyon atağı geçiren altı hastada dört tanesinin diğer merkezlerden hastanemize nakil olmaları diğer dikkat çeken bir durumdur. Bu dört hastanın bir tanesi eğitim ve araştırma hastanesinden, diğer üç tanesi ise özel sağlık kuruluşlarından hastanemize nakledilmişti. Bu durum ülkemizde MBL yaygınlığının tahminimizden daha büyük olabileceğini ve antibiyotik direnci açısından son derece riskli olan bu bakterilerin kolayca hastaneler arasında transfer olabileceğini düşündürmektedir.

*Pseudomonas* enfeksiyonlarında hastaların genel mortalitesi %31,6 (24/76) iken MBL olumlu *Pseudomonas* enfeksiyonlarında ise bu oran %50 olarak (3/6) sonuçlanmıştır. Hirakata ve ark. (150) tarafından MBL olumlu *Pseudomonas* enfeksiyonlarında mortalitenin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Çalışmamızda MBL olumlu *Pseudomonas* spp. sayısı istatistiksel olarak anlam taşıyacak büyüklükte olmadığı için anlamlı bir değerlendirme yapılamamıştır.

MBL olumlu etkenlerle gelişen enfeksiyonlarda kolistin veya kolistin ve rifampisin kombinasyonları genellikle tek tercih edilen antibiyotiklerdir (151-153). Tigesiklin de MBL olumlu enterobakterilerde ve *Acinetobacter* enfeksiyonlarında etkili bulunmuştur (154). Ancak kolistin temin edilemediği durumlarda karbapenemlerin kullanımı destekleyen yayınlar da bulunmaktadır (155, 156). Çalışmamızda, alternatif antibiyotiklerin hastanemizde bulunmaması nedeni ile, MBL olumlu *Pseudomonas* enfeksiyonlarının altı tanesine karbapenem ve aminoglikozit kombinasyon tedavisi, bir tanesinde de sefoperazon-sulbaktam tedavisi verilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

### 6.1 Sonuçlar:

1. Önceki yıllarla karşılaştırıldığında GNNFB hastanemizde hastane enfeksiyonları etkenleri arasında ilk sıraya yükselmiştir. GNNFB Yanık Servisi başta olmak üzere, yoğun bakım servislerinde yatan hastalarda daha sık izole edilmektedirler (%76).
2. Çalışmamızda çoklu antibiyotik direnci *Acinetobacter* suşlarında (%66,4) *Pseudomonas* suşlarına göre (%24,4) yüksek bulunmuştur. Buna paralel olarak mortalite oranları da *Acinetobacter* enfeksiyonlarında (%61,7) *Pseudomonas* enfeksiyonlarına göre (%35,1) daha yüksek saptanmıştır.
3. Yoğun bakımda yatıyor olmak, önceden sefalosporin veya karbapenem kullanımı, mekanik ventilasyon, hastanemize nakil olma, yanık, komorbid hastalığı bulunmak gibi parametreler GNNFB' de imipeneme direnç gelişimi açısından anlamlı risk faktörleri olarak saptanmıştır.
4. Çoklu antibiyotik dirençli *Acinetobacter* suşlarındaki yüksek antibiyogram fenotip benzerliği (%50,5), bu bakterilerin hastanemizin kalıcı florasına yerleştiğini ortaya koymaktadır.
5. MBL oranı GNNFB' de %2,5 olarak bulunmuş ve halen yurtdışında benzer çalışmalarda elde edilen MBL oranlarından düşük olduğu saptanmıştır.
6. Çalışmamızda imipenem direnci gösteren *Pseudomonas* suşlarının %16' sında ve imipeneme duyarlı olan suşların da %2,1' inde ülkemizde ilk kez IMP grubu MBL geni saptanmıştır. Bununla birlikte *Acinetobacter* suşlarında araştırılan MBL genlerinin varlığı gösterilememiştir.
7. Çoklu antibiyotik direncinde MBL oranı düşüktür. Dolayısı ile GNNFB' de çoklu antibiyotik direncinde diğer direnç mekanizmaları daha etkili gözükmemektedir. Ancak imipeneme duyarlı *Pseudomonas* suşlarında da MBL geni saptanmış olması ciddi bir potansiyel tehlikenin varlığına işaret etmektedir.

8. Hastanemizdeki servisler çalışmamız süresince iki kez taşınmış ve taşınmanın ardından değişen hastane florası ile birlikte GNNFB' in etken olduğu enfeksiyonların yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir. Bu durum hastane ortamında gerçekleştirilen inşaat ve taşınma gibi olağan dışı durumlarda GNNFB' in dirençli enfeksiyon riskinin arttığı akılda bulundurulmalıdır.

### **6.2 Öneriler:**

1. Dirençli bakterilerle gelişen hastane enfeksiyonları ile sık karşılaşılıyor olmamız nedeni ile hastaya ve laboratuara dayalı sürveyans kesintisiz sürdürülmelidir.
2. MBL varlığının araştırılmasında fenotipik yöntemlerin yeterince başarılı değildir ve MBL şüpheli izolatlarda mutlaka moleküler yöntemlerle doğrulama yapılmalıdır. Bu amaçla moleküler yöntemlerinin rutin laboratuvar uygulamasına dahil edilmesi için gerekli hazırlıklar yapılmalıdır.
3. Çoklu antibiyotik direnci GNNFB' in etken olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. Bu nedenle bu tip enfeksiyonların tedavisinde alternatif antibiyotiklerin hastanemizde temini gerekmektedir.
4. Çalışma süresince GNNFB izolasyon yoğunluğundaki artışların hastanemizin taşınması ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Dolayısı ile hastanelerde taşınma ve bina onarımı gibi hareketlilik dönemlerinde laboratuara dayalı sürveyans sıklaştırılmalıdır. Olası epidemilerin erken dönemde yakalanması için izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç profillerindeki değişimler yakından takip edilmelidir.
5. MBL oranımızın düşük olması sayesinde hastaya ve laboratuara dayalı aktif sürveyansla sorunun büyümesinin engellenebilir.
6. Endikasyon varlığında hastaların yoğun bakımda yatırılması, akılcı antibiotik kullanımı, diğer merkezlerden hastanemize nakil olan hastalarda ve komorbid hastalığı bulunanlarda temas önlemleri gibi uygulamalarla imipeneme direnç gelişimine neden olan risk faktörleri kontrol altına alınmalıdır.

7. Yanık Servisi' nde hasta ve yakınlarının giriş, çıkışlarının kontrol altına alınması ve temas önlemleri ile bu servisten hastanemize GNNFB' in yayılımını önlenmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Pellegrino, F.L., Casali, N., Dos Santos, K.R., Nouer, S.A., Scheidegger, E.M., Riley, L.W., Moreira, B.M., Pseudomonas aeruginosa epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil, J Chemother 18:151-156, 2006.
2. Bogaerts, P., Naas, T., Wybo, I., Bauraing, C., Soetens, O., Pierard, D., Nordmann, P., Glupczynski, Y., Outbreak of infection by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium, J Clin Microbiol 44:4189-4192, 2006.
3. Guducuoglu, H., Durmaz, R., Yaman, G., Cizmeci, Z., Berktaş, M., Durmaz, B., Spread of a single clone Acinetobacter baumannii strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey, New Microbiol 28:337-343, 2005.
4. Jones, R.N., Pfaller, M.A., Marshall, S.A., Hollis, R.J., Wilke, W.W., Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of resistance, molecular epidemiology, and screening for metallo-enzymes, Diagn Microbiol Infect Dis 29:187-192, 1997.
5. Oncul, O., Keskin, O., Acar, H.V., Kucukardali, Y., Evrenkaya, R., Atasoyu, E.M., Top, C., Nalbant, S., Ozkan, S., Emekdas, G., Cavuslu, S., Us, M.H., Pahsa, A., Gokben, M., Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake, J Hosp Infect 51:47-51, 2002.
6. Kavruk, U., Öncül, O., Özyurt, M., Acar, A., Haznedaroğlu, T., Çavuşlu, Ş., Hastane infeksiyonu etkeni olan gram negatif non-fermentatif bakterilerde karbapenem direncinin epidemiyolojik ve klinik boyutu: Prospektif çalışma, in XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Belek-ANTALYA, 14-18 Mart 2007, pp. SS-05.
7. Töreci, K., Hastane infeksiyonları, Bilimsel Tıp, Ankara, pp. 17-33, 2003.

8. Weinstein, R.A., Hayden, M.K., Multiply drug-resistant pathogens: Epidemiology and control, in *Hospital Infections*, edited by J.V. Bennet, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 215-236, 1998.
9. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 35:147-151, 1991.
10. Akalın, H., Yoğun bakım ünitelerinde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* ve diğer tedavisi zor gram negatif basiller, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 3:202-211, 1999.
11. Siegel, J., Rhinehart, E., Jackson, M., Chierello, L., Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006, edited by CDC, 2006.
12. Uzun, Ö., *Hastane infeksiyonlar*, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, pp. 33-57, 2003.
13. Jones, R.N., Deshpande, L., Fritsche, T.R., Sader, H.S., Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003), *Diagn Microbiol Infect Dis* 49:211-216, 2004.
14. Winn, W., *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore pp. 303-391, 2006.
15. Lampe, A.S., Reijden, T.J.K.v.d., Evaluation of commercial test systems for the identification of nonfermenters *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 3:301-305, 1984.
16. Isenberg, H., *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, ASM Press, 3.18.12.19-10, 2004.
17. Thomas, L., Russell, A.D., Maillard, J.Y., Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues, *J Appl Microbiol* 98:533-543, 2005.
18. Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P.,

- Malfroot, A., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium, *Clin Microbiol Infect* 13:560-578, 2007.
19. Mandell, G.L., *Principles and practice of infectious diseases*, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 2587-2615, 2005.
  20. Chastre, J., Fagon, J.Y., Ventilator-associated pneumonia, *Am J Respir Crit Care Med* 165:867-903, 2002.
  21. Nicotra, M.B., Rivera, M., Dale, A.M., Shepherd, R., Carter, R., Clinical, pathophysiologic, and microbiologic characterization of bronchiectasis in an aging cohort, *Chest* 108:955-961, 1995.
  22. Kurtaran, B., Saltoğlu, N., İnal, S., Taşova, Y., Özeren, A., Nöroloji yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonları, *ANKEM Derg* 19:119-124, 2005.
  23. Çelik, İ., İnci, N., Denk, A., Sevim, E., Yaşar, D., Yaşar, M.A., Prevalence of hospital acquired infections in anesthesiology intensive care unit, *Fırat Tıp Dergisi* 10:132-135, 2005.
  24. Krcmery, V., Koprnova, J., Gogova, M., Grey, E., Korcova, J., *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in cancer patients, *J Infect* 52:461-463, 2006.
  25. Sligl, W., Taylor, G., Brindley, P.G., Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes, *Int J Infect Dis* 10:320-325, 2006.
  26. Marra, A.R., Bearman, G.M., Wenzel, R.P., Edmond, M.B., Comparison of the systemic inflammatory response syndrome between monomicrobial and polymicrobial *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial bloodstream infections, *BMC Infect Dis* 5:94, 2005.
  27. Milstone, A.M., Ruff, A.J., Yeaman, C., Higman, M.A., *Pseudomonas aeruginosa* pre-septal cellulitis and bacteremia in a pediatric oncology patient, *Pediatr Blood Cancer* 45:353; discussion 354, 2005.

28. Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., Jung, R., Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options, *Pharmacotherapy* 25:1353-1364, 2005.
29. Hamasuna, R., Betsunoh, H., Sueyoshi, T., Yakushiji, K., Tsukino, H., Nagano, M., Takehara, T., Osada, Y., Bacteria of preoperative urinary tract infections contaminate the surgical fields and develop surgical site infections in urological operations, *Int J Urol* 11:941-947, 2004.
30. Zarakolu, P., Hascelik, G., Unal, S., [Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004)], *Mikrobiyol Bul* 40:147-154, 2006.
31. Gülay, Z., Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası, *ANKEM Derg* 19:66-77, 2005.
32. Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C., Durmaz, R., Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey, *Am J Infect Control* 34:188-192, 2006.
33. Akcam, F.Z., Karaaslan, D., Dogan, M., Yayli, G., Microbiological surveillance in the intensive care unit: a tertiary hospital experience, *Med Sci Monit* 12:CR81-85, 2006.
34. Rhomberg, P.R., Jones, R.N., Antimicrobial spectrum of activity for meropenem and nine broad spectrum antimicrobials: report from the MYSTIC Program (2002) in North America, *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:365-372, 2003.
35. Pascual, A., Perea, E., Alvarez, M., Casal, M., Garcia de Lomas, J., Garcia Rodriguez, J.A., Martin, R., Soria, G., Zapardiel, J., The Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection antimicrobial susceptibility program in Spain: a 5-year analysis, *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:195-200, 2007.

36. Turner, P.J., Meropenem and imipenem activity against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the MYSTIC Program, *Diagn Microbiol Infect Dis* 56:341-344, 2006.
37. Fidan, I., Çetin, F., Yüksel, S., Sultan, N., *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı, *ANKEM Derg* 19:68-70, 2005.
38. Bayram, A., Balci, I., Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey, *BMC Infect Dis* 6:155, 2006.
39. Rhomberg, P.R., Jones, R.N., Sader, H.S., Results from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme: report of the 2001 data from 15 United States medical centres, *Int J Antimicrob Agents* 23:52-59, 2004.
40. Turner, P., Use of a program-specific website to disseminate surveillance data obtained from the MYSTIC study., *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 53:273-279, 2005.
41. Ardiç, N., Özyurt, M., Ilga, U., Erdemoğlu, A., Haznedaroğlu, T., Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları, *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM)* 18:145-148, 2004.
42. Vaisvila, R., Morgan, R.D., Posfai, J., Raleigh, E.A., Discovery and distribution of super-integrans among pseudomonads, *Mol Microbiol* 42:587-601, 2001.
43. Kohler, T., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Kahr, A.L., Pechere, J.C., Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 41:2540-2543, 1997.
44. Kohler, T., Michea-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., Pechere, J.C., Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol Microbiol* 23:345-354, 1997.

45. Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M.S., Boyer, E., Chamberland, S., Lee, V.J., Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 43:1340-1346, 1999.
46. Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G., Nordmann, P., GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem, *Antimicrob Agents Chemother* 45:2598-2603, 2001.
47. Aktas, Z., Poirel, L., Salcioglu, M., Ozcan, P.E., Midilli, K., Bal, C., Ang, O., Nordmann, P., PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey, *Clin Microbiol Infect* 11:193-198, 2005.
48. Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksall, I., Kocazeybek, B., Tatman-Otkun, M., Leblebicioglu, H., Ozinel, M.A., Akalin, H., Kocagoz, S., Korten, V., Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains, *J Med Microbiol* 50:642-645, 2001.
49. Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?, *Clin Microbiol Rev* 18:306-325, 2005.
50. Walsh, T.R., The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol Infect* 11 Suppl 6:2-9, 2005.
51. Mounneimne, H., Robert, J., Jarlier, V., Cambau, E., Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 43:62-66, 1999.
52. Shah, P.B., Giudice, J.C., Griesback, R., Jr., Morley, T.F., Vasoya, A., The newer guidelines for the management of community-acquired pneumonia, *J Am Osteopath Assoc* 104:521-526, 2004.

53. Iregui, M., Ward, S., Sherman, G., Fraser, V.J., Kollef, M.H., Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia, *Chest* 122:262-268, 2002.
54. Micol, J.B., de Botton, S., Guieze, R., Coiteux, V., Darre, S., Dessein, R., Leroy, O., Yakoub-Agha, I., Quesnel, B., Bauters, F., Beaucaire, G., Alfandari, S., An 18-case outbreak of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in hematology patients, *Haematologica* 91:1134-1138, 2006.
55. Michalopoulos, A.S., Tsiodras, S., Rellos, K., Mentzelopoulos, S., Falagas, M.E., Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic, *Clin Microbiol Infect* 11:115-121, 2005.
56. Schina, M., Spyridi, E., Daoudakis, M., Mertzanos, E., Korfiatis, S., Successful treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* meningitis with intravenous and intrathecal colistin, *Int J Infect Dis* 10:178-179, 2006.
57. Koch, C., Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease, *Pediatr Pulmonol* 34:232-236, 2002.
58. Lee, T.W., Brownlee, K.G., Denton, M., Littlewood, J.M., Conway, S.P., Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center, *Pediatr Pulmonol* 37:104-110, 2004.
59. Frederiksen, B., Koch, C., Hoiby, N., Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995), *Pediatr Pulmonol* 28:159-166, 1999.
60. Frederiksen, B., Koch, C., Hoiby, N., Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol* 23:330-335, 1997.
61. Littlewood, J.M., Miller, M.G., Ghoneim, A.T., Ramsden, C.H., Nebulised colomycin for early *pseudomonas* colonisation in cystic fibrosis, *Lancet* 1:865, 1985.

62. Valerius, N.H., Koch, C., Hoiby, N., Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment, *Lancet* 338:725-726, 1991.
63. Taccetti, G., Repetto, T., Procopio, E., Farina, S., Campana, S., Early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis patients, *Lancet* 359:625-626, 2002.
64. de Groot, R., Smith, A.L., Antibiotic pharmacokinetics in cystic fibrosis. Differences and clinical significance, *Clin Pharmacokinet* 13:228-253, 1987.
65. Paul, M., Benuri-Silbiger, I., Soares-Weiser, K., Leibovici, L., Beta lactam monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials, *Bmj* 328:668, 2004.
66. Cunha, B.A., Ventilator-associated pneumonia: monotherapy is optimal if chosen wisely, *Crit Care* 10:141, 2006.
67. Chastre, J., Wolff, M., Fagon, J.Y., Chevret, S., Thomas, F., Wermert, D., Clementi, E., Gonzalez, J., Jusserand, D., Asfar, P., Perrin, D., Fieux, F., Aubas, S., Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial, *Jama* 290:2588-2598, 2003.
68. Eggimann, P., Revelly, J.P., Should antibiotic combinations be used to treat ventilator-associated pneumonia?, *Semin Respir Crit Care Med* 27:68-81, 2006.
69. Ferrara, A.M., Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia, *Int J Antimicrob Agents* 27:183-195, 2006.
70. Murray, C.K., Infections in burns, *J Trauma* 62:S73, 2007.
71. Bergogne-Berezin, E., Treatment of *Acinetobacter* infections, *Expert Opin Investig Drugs* 6:119-127, 1997.
72. Van Looveren, M., Goossens, H., Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe, *Clin Microbiol Infect* 10:684-704, 2004.

73. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servis Şefliği Antibiyotik duyarlılık test sonuçları (Yatan hasta), GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı, 2005.
74. Wroblewska, M.M., Towner, K.J., Marchel, H., Luczak, M., Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland, *Clin Microbiol Infect* 13:490-496, 2007.
75. Gülhan, B., Özekinci, T., Atmaca, S., Bilek, H., 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci, *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM)* 21:32-36, 2007.
76. Çetin, E.S., Kaya, S., Tetik, T., Cicioğlu, B., Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 20:202-205, 2006.
77. Gazi, H., Sürücüoğlu, S., Kurutepe, S., İnmez, E., Dinç, G., Özbakkaloğlu, b., Yoğun bakım ünitesinde ve diğer ünitelerde yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında in-vitro antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 19:115-118, 2005.
78. Livermore, D.M., The threat from the pink corner, *Ann Med* 35:226-234, 2003.
79. Quale, J., Bratu, S., Landman, D., Heddurshetti, R., Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City, *Clin Infect Dis* 37:214-220, 2003.
80. Clark, N.M., Patterson, J., Lynch, J.P., 3rd, Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit, *Curr Opin Crit Care* 9:413-423, 2003.
81. Urban, C., Segal-Maurer, S., Rahal, J.J., Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Clin Infect Dis* 36:1268-1274, 2003.
82. Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., Carmeli, Y., Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting, *Curr Opin Infect Dis* 18:306-313, 2005.

83. Barnea, Y., Carmeli, Y., Gur, E., Kuzmenko, B., Gat, A., Neville, L.F., Eren, R., Dagan, S., Navon-Venezia, S., Efficacy of antibodies against the N-terminal of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin for treating infections in a murine burn wound model, *Plast Reconstr Surg* 117:2284-2291, 2006.
84. Gales, A.C., Jones, R.N., Forward, K.R., Linares, J., Sader, H.S., Verhoef, J., Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999), *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2:S104-113, 2001.
85. Senol, E., *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen, *J Hosp Infect* 57:1-7, 2004.
86. Kataoka, D., Fujiwara, H., Kawakami, T., Tanaka, Y., Tanimoto, A., Ikawa, S., Tanaka, Y., The indirect pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Int J Antimicrob Agents* 22:601-606, 2003.
87. Payne, D.J., Cramp, R., Bateson, J.H., Neale, J., Knowles, D., Rapid identification of metallo- and serine beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 38:991-996, 1994.
88. Livermore, D.M., Woodford, N., Carbapenemases: a problem in waiting?, *Curr Opin Microbiol* 3:489-495, 2000.
89. Denton, M., Todd, N.J., Kerr, K.G., Hawkey, P.M., Littlewood, J.M., Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples, *J Clin Microbiol* 36:1953-1958, 1998.
90. Rahmati-Bahram, A., Magee, J.T., Jackson, S.K., Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in *Stenotrophomonas maltophilia*, *J Antimicrob Chemother* 39:19-24, 1997.
91. Poole, K., Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol Infect* 10:12-26, 2004.

92. Sader, H.S., Jones, R.N., Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli, *Int J Antimicrob Agents* 25:95-109, 2005.
93. Denton, M., Kerr, K.G., Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clin Microbiol Rev* 11:57-80, 1998.
94. Wang, W.S., Liu, C.P., Lee, C.M., Huang, F.Y., *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in adults: four years' experience in a medical center in northern Taiwan, *J Microbiol Immunol Infect* 37:359-365, 2004.
95. Lipuma, J.J., Update on the *Burkholderia cepacia* complex, *Curr Opin Pulm Med* 11:528-533, 2005.
96. Hutchinson, J., Runge, W., Mulvey, M., Norris, G., Yetman, M., Valkova, N., Villemur, R., Lepine, F., *Burkholderia cepacia* infections associated with intrinsically contaminated ultrasound gel: the role of microbial degradation of parabens, *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:291-296, 2004.
97. Nasser, R.M., Rahi, A.C., Haddad, M.F., Daoud, Z., Irani-Hakime, N., Almawi, W.Y., Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia traced to contaminated hospital water used for dilution of an alcohol skin antiseptic, *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:231-239, 2004.
98. Moreira, B.M., Leobons, M.B., Pellegrino, F.L., Santos, M., Teixeira, L.M., de Andrade Marques, E., Sampaio, J.L., Pessoa-Silva, C.L., *Ralstonia pickettii* and *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections related to infusion of contaminated water for injection, *J Hosp Infect* 60:51-55, 2005.
99. CDC, Manufacturer's recall of nasal spray contaminated with *Burkholderia cepacia* complex. , *Morb Mortal Wkly Rep*:246, 2004.
100. Hancock, R.E., Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria, *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1:S93-99, 1998.
101. Cornaglia, G., Akova, M., Amicosante, G., Canton, R., Cauda, R., Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-

negative pathogens: open issues, International Journal of Antimicrobial Agents Article in press, 2007.

102. [www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/).

103. Nordmann, P., Poirel, L., Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, Clin Microbiol Infect 8:321-331, 2002.

104. Marchiaro, P., Mussi, M.A., Ballerini, V., Pasteran, F., Viale, A.M., Vila, A.J., Limansky, A.S., Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- $\beta$ -lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria, J Clin Microbiol 43:5648-5652, 2005.

105. Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y., Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp, J Clin Microbiol 41:4623-4629, 2003.

106. Goto, M., Takahashi, T., Yamashita, F., Koreeda, A., Mori, H., Ohta, M., Arakawa, Y., Inhibition of the metallo-beta-lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds, Biol Pharm Bull 20:1136-1140, 1997.

107. Jin, W., Arakawa, Y., Yasuzawa, H., Taki, T., Hashiguchi, R., Mitsutani, K., Shoga, A., Yamaguchi, Y., Kurosaki, H., Shibata, N., Ohta, M., Goto, M., Comparative study of the inhibition of metallo-beta-lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group, Biol Pharm Bull 27:851-856, 2004.

108. Yong, D., Lee, K., Yum, J.H., Shin, H.B., Rossolini, G.M., Chong, Y., Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp, J Clin Microbiol 40:3798-3801, 2002.

109. Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D., Yum, J.H., Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, Clin Microbiol Infect 7:88-91, 2001.

110. Chu, Y.W., Cheung, T.K., Ngan, J.Y., Kam, K.M., EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in

*Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method, *Int J Antimicrob Agents* 26:340-341, 2005.

111. Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Sader, H.S., Fritsche, T.R., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances, *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 51:77-84, 2005.

112. Franklin, C., Liolios, L., Peleg, A.Y., Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory, *J Clin Microbiol* 44:3139-3144, 2006.

113. Deshpande, L., Sader, H., Fritsche, T., Jones, R., Emergence and dissemination of metallo beta lactamases producing strains in Europe: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000-2006), in *17th ECCMID/25th ICC, Munich, Germany* Abstract book, Apr 2007, p. S131.

114. Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G.M., Cornaglia, G., Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey, *J Antimicrob Chemother* 54:282-283, 2004.

115. Aktas, Z., Bal, C., Midilli, K., Poirel, L., Nordmann, P., First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey, *Clin Microbiol Infect* 12:695-696, 2006.

116. Lagatolla, C., Edalucci, E., Dolzani, L., Riccio, M.L., De Luca, F., Medessi, E., Rossolini, G.M., Tonin, E.A., Molecular evolution of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity, *J Clin Microbiol* 44:2348-2353, 2006.

117. Migliavacca, R., Docquier, J.D., Mugnaioli, C., Amicosante, G., Daturi, R., Lee, K., Rossolini, G.M., Pagani, L., Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Clin Microbiol* 40:4388-4390, 2002.

118. Deplano, A., Rodriguez-Villalobos, H., Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Allemeersch, D., Grimmelprez, A., Mascart, G., Berges, L., Byl, B., Laurent, C., Struelens, M.J., Emergence and dissemination of multidrug

- resistant clones of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in Belgium, *Euro Surveill* 12:E070118 070112, 2007.
119. Oh, E.J., Lee, S., Park, Y.J., Park, J.J., Park, K., Kim, S.I., Kang, M.W., Kim, B.K., Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase, *J Microbiol Methods* 54:411-418, 2003.
120. Wang, C.X., Mi, Z.H., Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-1 metallo-beta-lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD, *J Med Microbiol* 55:353-354, 2006.
121. Fiett, J., Baraniak, A., Mrowka, A., Fleischer, M., Drulis-Kawa, Z., Naumiuk, L., Samet, A., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland, *Antimicrob Agents Chemother* 50:880-886, 2006.
122. Zanetti, G., Blanc, D., Federli, I., Rafoul, W., Petignat, C., Naravic, P., Francioli, P., Berger, M., Importation of *Acinetobacter baumannii* into a burn unit: a recurrent outbreak of infection associated with widespread environmental contamination., *Infection control and Hospital Epidemiology* 28:723-725, 2007.
123. Georges, B., Conil, J.M., Dubouix, A., Archambaud, M., Bonnet, E., Saivin, S., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cougot, P., Decun, J.F., Mathe, O., Chabanon, G., Marty, N., Seguin, T., Houin, G., Risk of emergence of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to beta-lactam antibiotics in intensive care units, *Crit Care Med* 34:1636-1641, 2006.
124. del Mar Tomas, M., Cartelle, M., Pertega, S., Beceiro, A., Llinares, P., Canle, D., Molina, F., Villanueva, R., Cisneros, J.M., Bou, G., Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection, *Clin Microbiol Infect* 11:540-546, 2005.
125. Brahmi, N., Blel, Y., Kouraichi, N., Lahdhiri, S., Thabet, H., Hedhili, A., Amamou, M., Impact of ceftazidime restriction on gram-negative

- bacterial resistance in an intensive care unit, *J Infect Chemother* 12:190-194, 2006.
126. Lautenbach, E., Weiner, M.G., Nachamkin, I., Bilker, W.B., Sheridan, A., Fishman, N.O., Imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk factors for infection and impact of resistance on clinical and economic outcomes, *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:893-900, 2006.
127. Fortaleza, C.M., Freire, M.P., Filho Dde, C., de Carvalho Ramos, M., Risk factors for recovery of imipenem- or ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to a teaching hospital in Brazil, *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:901-906, 2006.
128. Baran, G., Erbay, A., Bodur, H., Öngürü, P., Akıncı, E., balaban, N., Çevik, M., Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Article in press., *International Journal of Infectious Diseases* 2007, 2007.
129. Bonomo, R.A., Szabo, D., Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2:S49-56, 2006.
130. Armour, A., Shankowsky, H., Swanson, T., Lee, J., Tredget, E., The impact of nosocomially-acquired resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn unit., *The Journal of Trauma, Injury, Infection and Critical Care* 63:164-171, 2007.
131. Trottier, V., Segura, P.G., Namias, N., King, D., Pizano, L.R., Schulman, C.I., Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients, *J Burn Care Res* 28:248-254, 2007.
132. Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watari, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, M., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T., Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan, *J Clin Microbiol* 45:979-989, 2007.

133. Zarrilli, R., Casillo, R., Di Popolo, A., Tripodi, M.F., Bagattini, M., Cuccurullo, S., Crivaro, V., Ragone, E., Mattei, A., Galdieri, N., Triassi, M., Utili, R., Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy, *Clin Microbiol Infect* 13:481-489, 2007.
134. Landman, D., Bratu, S., Alam, M., Quale, J., Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B, *J Antimicrob Chemother* 55:954-957, 2005.
135. Landman, D., Quale, J.M., Mayorga, D., Adedeji, A., Vangala, K., Ravishankar, J., Flores, C., Brooks, S., Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned, *Arch Intern Med* 162:1515-1520, 2002.
136. Akıncı, E., Çolpan, A., Bodur, H., Balaban, N., Erbay, A., Risk factors for ICU-acquired imipenem-resistant Gram-negative bacterial infections, *Journal of Hospital Infection* 59:317-323, 2005.
137. Maniati, M., Ikonomidis, A., Mantzana, P., Daponte, A., Maniatis, A.N., Pournaras, S., A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD, *J Antimicrob Chemother* 60:132-135, 2007.
138. Lister, P.D., Wolter, D.J., Wickman, P.A., Reisbig, M.D., Levofloxacin/imipenem prevents the emergence of high-level resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains already lacking susceptibility to one or both drugs, *J Antimicrob Chemother* 57:999-1003, 2006.
139. Lolans, K., Rice, T.W., Munoz-Price, L.S., Quinn, J.P., Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40, *Antimicrob Agents Chemother* 50:2941-2945, 2006.
140. Bertini, A., Poirel, L., Bernabeu, S., Fortini, D., Villa, L., Nordman, P., Carattoli, A., Multicopy blaOXA-58 gene as source of high level

resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 51:2324-2328, July 2007.

141. Bou, G., Cervero, G., Dominguez, M.A., Quereda, C., Martinez-Beltran, J., Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 38:3299-3305, 2000.

142. Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A., Kolayli, F., Eroglu, C., High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres, *J Antimicrob Chemother* 58:537-542, 2006.

143. Aygün, G., Demirkıran, O., Utku, T., Mete, B., Ürkmez, S., Yılmaz, M., Yaşar, H., Dikmen, Y., Öztürk, R., Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit., *Journal of Hospital Infection* 52:259-262, 2002.

144. Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G., How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infect Dis* 6:130, 2006.

145. Toraman, Z.A., Yakupogullari, Y., Kizirgil, A., Detection of metallo beta-lactamase production and antibiotic resistance with E-test method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains, in Turkey, *J Infect Chemother* 10:257-261, 2004.

146. Berges, L., Rodriguez-Villalobos, H., Deplano, A., Struelens, M.J., Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and Etest for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 59:812-813, 2007.

147. Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., Gombac, F., Bearzi, C., Edalucci, E., Gionechetti, F., Rossolini, G.M., Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-

beta-lactamase determinants in European hospital, *Emerg Infect Dis* 10:535-538, 2004.

148. Paterson, D.L., Ko, W.C., Gutenberg, A.v., Casellas, J.M., Mülazimoğlu, L., Klugman, K.P., Bonomo, R.A., Rice, L.B., McCormack, J.G., Yu, V.L., Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta lactamases: implications for clinical microbiology laboratory, *Journal of Clinical Microbiology* 39:2206-2212, 2001.

149. Peleg, A.Y., Franklin, C., Bell, J.M., Spelman, D.W., Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia, *Clin Infect Dis* 41:1549-1556, 2005.

150. Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Nakano, M., Izumikawa, K., Mine, M., Aoki, S., Kondoh, A., Matsuda, J., Hirayama, M., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Kohno, S., Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect Dis* 37:26-32, 2003.

151. Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R., Paterson, D.L., Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections, *Lancet Infect Dis* 6:589-601, 2006.

152. Giamarellos-Bourboulis, E.J., Sambatakou, H., Galani, I., Giamarellou, H., In vitro interaction of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *J Chemother* 15:235-238, 2003.

153. Petrosillo, N., Chinello, P., Proietti, M., Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse effects, *Clinical Microbiology & Infection* 11:682-683, 2005.

154. Souli, M., Kontopidou, F., Krotzanis, E., In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram negative and gram positive clinical isolates from Greek hospitals., *Antimicrob Agents Chemother* 50:3166-3169, 2006.

155. Lee, N.Y., Yan, J.J., Lee, H.C., Liu, K.H., Huang, S.T., Ko, W.C., Clinical experiences of bacteremia caused by metallo-beta-lactamase-producing gram-negative organisms, *J Microbiol Immunol Infect* 37:343-349, 2004.
156. Daikos, G., Panagiotakopoulou, A., Tzelepi, E., Loli, A., Tzouveleakis, L., Miriagou, V., Activity of imipenem against VIM-1 metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in the murine thigh infection model., *Clinical Microbiology & Infection*:doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01590.x, 2006.