

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN GRAM-
NEGATİF BASILLERDE METALLO-B-
LAKTAMAZ'LARIN FENOTİPIK-GENOTİPIK OLARAK
ARAŞTIRILMASI VE SUŞLARIN FİLOGENETİK
ANALİZİ**

Farzad HEYDARI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2016

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN GRAM-
NEGATİF BASİLLERDE METALLO-B-
LAKTAMAZ'LARIN FENOTİPİK-GENOTİPİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI VE SUŞLARIN FİLOGENETİK
ANALİZİ**

Farzad HEYDARI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TF2014DI nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA-2016

KABUL ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“ Klinik örneklerden izole edilen gram negatif basillerde Metallo-Beta-Laktamaz’ların fenotipik-genotipik olarak araştırılması ve suşların filogenetik analizi.”
adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 20 / 01 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Akgün Yaman
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mehmet Sami Serin
Mersin Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Nizami Duran
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Behice Kurtaran
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşım danıştığım, tezimin belirlenmesinde ve yürütmesinde büyük yardımlarını gördüğüm, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, danışman hocam Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı; Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, bilimsel vizyonumun gelişmesinde gösterdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Akgün YAMAN'a, Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, Prof. Dr. Macit İLKİT'e, Yar. Doç. Dr. Togrul NAGİYEV'e, tez çalışmama yardımı ve katkılarından dolayı, son ana kadar yanımda bulunarak destek gösteren değerli arkadaşım Doktora öğrencisi Suna Kızılyıldırım' a ve bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN'e çalışma dönemim boyunca aynı sıcak ortamı paylaştığım ve bana destek olmaktan hiçbir zaman kaçınmayan tüm çalışma arkadaşlarıma ve bölümümüz personellerine, tüm hayatım boyunca sevgi, saygı ve desteklerini esirgemeyen hayattaki en değerli varlıklarım olan babama, anneme ve kardeşime, en içten duygularıyla sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Farzad HEYDARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY	3
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	13
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. Beta Laktam Antibiyotikler	17
2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	18
2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması	19
2.3.1. İlacın hedef bölgesi olan PBP’lerde meydana gelen değişiklikler	19
2.3.2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması	20
2.3.3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi	20
2.3.4. Eflüks (Atım) Pompası	21
2.4. Beta-Laktamazlar	21
2.4.1. Grup 1 Kromozomal Beta Laktamazlar	24
2.4.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta Laktamazlar	25
2.4.2.1. Grup 2a	27
2.4.2.2. Grup 2b	27
2.4.2.3. Grup 2be	27
2.4.2.4. Grup 2br	28
2.4.2.5. Grup 2c	28
2.4.2.6. Grup 2d	28
2.4.2.7. Grup 2e	28
2.4.2.8. Grup 2f	29
2.4.3. Grup 3 Beta Laktamazlar (Metallo-β-Laktamazlar)	29

2.4.4. MBL'ların sınıflandırılması	30
2.5. Beta Laktamazların Tespiti	33
2.5.1. GSBL tanı yöntemleri	33
2.5.2. Metallo- β -laktamaz enzimini tespit etme yöntemleri	35
2.5.2.1. Kombine disk yöntemi	36
2.5.2.2. Modifiye Hodge testi	36
2.5.2.3. E-test yöntemi	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Test suşlarının üretilmesi, identifikasyonu:	38
3.2. Modifiye hodge testi ile karbapenem direncinin doğrulanması.....	38
3.2.1. Mueller-Hinton Broth	39
3.2.2. Mueller-Hinton Agar	39
3.3. CLSI kriterlerine göre Disk Difüzyon metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi.....	39
3.3.1. Kirby bauer disk difüzyon testi.....	40
3.3.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri	41
3.4. Moleküler çalışmalar için DNA eldesi ve PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu.....	42
3.4.1. Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve enzimler	42
3.4.1.1. TE Buffer	42
3.4.1.2. dNTP Karışımı	42
3.4.1.3. Marker	42
3.4.1.4. Taq DNA polimeraz enzimi.....	42
3.4.1.5. 10xTBE Solüsyonu	42
3.4.1.6. Etidyum bromid	43
3.4.2. DNA Eldesi.....	43
3.4.3. PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu.....	44
3.5. Çoğaltılan genlerin dizi analizi	46
3.5.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	46
3.5.2. Dizi analizi çalışmaları	47
3.5.3. Dizi Analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	47

3.6. Klonal ilişkinin tespiti.....	47
3.6.1. PFGE Protokol, KEPA (Klebsiella, E.coli, P.aeruginosa, Acinetobacter) ..	48
3.6.1.1. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	52
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	87



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. B-laktam halkasına göre antibiyotikler	18
Şekil 2. Gram-negatif bakterilerde direnç mekanizmaları	19
Şekil 3. GSBL Testleri (<i>E.Coli</i> ve <i>Klebsiella</i> spp için)	34
Şekil 4. Kombine disk ve Modifiye Hodge Testi pozitif izolatın oluşturduğu görünüm.	55
Şekil 5. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi.....	56
Şekil 6. <i>K. pneumoniae</i> izolatına ait	65
Şekil 7. <i>A. baumannii</i> izolatına ait.....	65
Şekil 8. <i>E.coli</i> izolatına ait.....	65
Şekil 9. Dizi analizi sonucu elde edilen <i>E.coli</i> izolatında NDM-1 tipi karbapenemaz geninin BLAST taraması.....	65
Şekil 10. PFGE sonucu elde edilen <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının filogenetik ilişkileri.....	67
Şekil 11. PFGE sonucu elde edilen <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının filogenetik ilişkileri.....	68
Şekil 12. PFGE sonucu elde edilen <i>K. pneumoniae</i> filogenetik ilişkileri	69

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Beta-laktamazların sınıflandırılması	23
Tablo 2. CLSI kriterleri	40
Tablo 3. Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları	41
Tablo 4. Multiplex-PCR’da kullanılan primerler ^{69,70}	45
Tablo 5. PCR’la karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan primerler ⁷¹	46
Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen 130 izolatın tür dağılımı	55
Tablo 7. <i>A. Baumanii</i> (88 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	56
Tablo 8. <i>P. aeruginosa</i> (26 izolat) Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	57
Tablo 9. <i>K. pneumoniae</i> (9 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	58
Tablo 10. <i>E. coli</i> (3 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	58
Tablo 11. <i>Chryseobacterium indologenes</i> (2 izolat) Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	59
Tablo 12. <i>Proteus mirabilis</i> (1izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	59
Tablo 13. <i>Enterobacter cloacae</i> (1izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları	60
Tablo 14. PCR sonucu <i>A. Baumanii</i> (88) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.	61
Tablo 15. PCR sonucu <i>P. aeruginosa</i> (26) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.....	61
Tablo 16. PCR sonucu <i>K. pneumoniae</i> (9) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.....	61
Tablo 17. Multiplex-PCR sonucu kökenlerde amplifiye edilen β -laktamaz genlerinin dağılımı.	62
Tablo 18. Dizi analizi yapılan karbapenemaz genlerinin sub-tip sonuçları	65

KISALTMALAR

AMP	: Ampisilin
ATM	: Aztreonam
B-laktamaz	: Beta laktamaz (β -laktamaz)
bp	: Baz çifti
CAZ	: Seftazidim
CİP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical laboratory Standart Institute
CN	: Gentamisin
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
dk	: Dakika
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
FOX	: Sefoksitin
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu B-laktamaz
HCl	: Hidroklorik asit
İBL	: İndüklenmiş Beta Laktamazlar
IMP	: İmipenem
L	: Litre
KDT	: Kombine disk testi
M	: Koloni Mukoid (Sümüksü) koloni
MBL	: Metallo- β -laktamaz
Mg	: Miligram
MHA	: Mueller-Hinton Agar
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH	: Power of Hydrogen (Asidite)
pmol	: Pikomol

R Koloni	: Rough (Düzensiz) koloni
SAM	: Ampisilin/sulbaktam
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre



ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram-Negatif Basillerde Metallo- β -Laktamaz'ların Fenotipik-Genotipik Olarak Araştırılması ve Suşların Filogenetik Analizi

Karbapenemler çoklu dirençli Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Karbapenem direncinin en önemli mekanizmalarından birisi de metallo- β -laktamazların (MBL) üretimidir. MBL genleri kromozomda ya da plazmidde bulunur ve bakteri suşları arasında kolayca yayılabilir. Bu nedenle MBL'lara bağlı antimikrobiyal direncin epidemiyolojisi ile ilgili veriler antibiyotik politikasının ve tedavi şeklinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir.

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD' da 01.03.2014-05.09.2015 tarihleri arasında çeşitli klinik enfeksiyonlardan izole edilen karbapeneme dirençli olduğu belirlenen Gram-negatif bakterilerin, fenotipik yöntemlerle çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi ve genotipik yöntemlerle dirence yol açan enzimlerin belirlenerek epidemiyolojik veriler sunulması ve klonal ilişkilerinin PFGE yöntemi ile belirlenmesi amaçlandı.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Balcalı hastanesinde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan izole edilen 450 karbapenem dirençli Gram-negatif bakteri kombine disk ve modifiye Hodge testi yöntemleri ile araştırıldı ve metallo- β -laktamaz üreten 130 Gram-negatif bakteri tespit edildi. Bakterilerin *invitro* şartlarda antibiyotiklere direnç durumları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Çalışmaya dahil edilen suşlar arasında en yüksek direncin % 99.23 ile meropenem'e karşı, en düşük direncin ise %5.38 ile Kolistin'e karşı geliştiği görüldü.

Çalışma sonunda; karbapenem dirençli Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında güvenle kullanılabilecek tek antibiyotiğin kolistin olduğu görüldü. Karbapenem direncinin genotipik olarak analiz edilmesinden sonra tüm türlerde en baskın karbapenemaz genlerinin OXA-51, OXA-23-like ve OXA-24-like olduğu, non-fermenterler ve Enterobacteriaceae türlerinde ise NDM, TEM, VIM, GES ve CTX-M tipi genlerin karbapenem direncinden sorumlu karbapenemaz enzimleri olduğu belirlendi. Ayrıca suşların klonal ilişkisi PFGE yöntemiyle irdelendiğinde, yakın ilişkili olarak değerlendirilen klonların persiste olduğu, bu klonların hastanemizin farklı kliniklerinde yerleştiği ve çeşitli hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: CLSI, Gram-negatif basil , Karbapenem, MBL

ABSTRACT

Phenotypical-Genotypical Investigation of Metallo- β -Lactamases Identified From Clinical Gram-Negative Bacilli and Phylogenetical Analysis of Isolates

Carbapenems have become the most frequently used antibiotics in the treatment of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections. One of the major mechanisms of

carbapenem resistance is the production of metallo- β -lactamases (MBLs). MBL genes can reside on chromosome or plasmids and easily spread among bacterial species and strains. Therefore, data on the epidemiology of antimicrobial resistance due to MBLs is critically important in the determination of antibiotic policies and therapeutic decisions.

In this study in Çukurova University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, between March 1st, 2014 and September 5th, 2015, the aim was to determine by phenotypical methods the antibacterial drug susceptibility patterns of carbapenem-resistant Gram-negatives isolated from a variety of clinical infections, to determine the enzymes associated with resistance by using genotypical methods and to analyze their clonal relatedness by PFGE.

Four hundred-fifty carbapenem resistant Gram-negative bacilli isolated from patients admitted in various clinical wards were tested. The *in vitro* antimicrobial resistance of bacteria was determined by the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. One hundred thirty isolates tested positive for the production of metallo- β -lactamases by the combined disk test and the modified Hodge test. The most frequent resistance among the strains included in the present study was observed against meropenem with a rate of 99.23%, while the lowest prevalence was obtained against colistin with 5.38 %.

After analyzing the carbapenem resistance genetic determinants, the most dominant carbapenemase genes were OXA-51, OXA-23-like and OXA-24-like. NDM, TEM, VIM and GES were found to be responsible for carbapenem resistance in both Enterobacteriaceae and non-fermenter species. In addition, after the analysis of clonal relationship by PFGE, the isolates identified as closely related were observed to be persistent, settled in different wards of our hospital, and responsible for a wide range of hospital-acquired infections.

Resistance to carbapenems associated with different genetic determinants is largely diffuse in our healthcare settings. The only reliable antibiotic in infections caused by carbapenem resistant Gram-negative bacilli appears to be colistin. A wise use of antibiotics by implementing a strict antibiotic stewardship is necessary to control further dissemination of multiresistance.

Key Words: Carbapenems, Gram-negative bacilli, MBLs, CLSI

1. GİRİŞ

Yeryüzünün en eski canlıları olarak bilinen ve yaşadıkları mikroçevreye gen insersiyonları, delesyonel mutasyonlar ve/veya tek nokta mutasyonları sayesinde, hızla adapte olma yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar yaklaşık olarak 3.8 milyar yıldır varlıklarını sürdürmektedirler. Bu olağanüstü mutasyonel değişim ve gen plastisitesi yetenekleri sayesinde yaşama ve çoğalmalarını engelleyecek ısı, pH ve kuruluk gibi fiziki, antibiyotikler ve dezenfektanlar gibi kimyasal ajanlara karşıda kısa sürede direnç geliştirebilen mikroorganizmalar, oluşturdıkları enfeksiyonlar ile yüksek morbiditenin yanı sıra mortaliteninde sebebi haline gelmiştir. İrrasyonel antibiyotik kullanımı sonucu ortaya çıkan dirençli suşların sebep olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaşanan başarısızlıklar özellikle hastanelere yatış endikasyonu olan hastalarda ciddi ekonomik kayıplara da yol açarak sosyal güvenlik kurumlarının tedavi giderleri yükünüde önemli derecede artırmıştır. Bu bağlamda özellikle yoğun bakım ünitelerinde sıkça karşılaşılan Gram-negatif bakterilerin, kullanılan antibiyotiklerin neredeyse tamamına karşı direnç geliştirmesi ve sıklıkla mobil genetik elementlerde kodlanan direnç genlerinin hastanelerde ve toplumda, özellikle pis su atık sistemlerinde bakteriler arasında hızla yayılması, sadece yatan hastada yatış sonrası ortaya çıkan ekzojen yani hastane kaynaklı değil, hastanın hastaneye yatış öncesi toplumda kazanılmış ve florasına kolonize olmuş dirençli suşlardan kaynaklanan endojen kökenli mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonları da tedavi edilemez yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlar haline getirmiştir. Yoğun bakım üniteleri, yanık ünitesi gibi doğal immun sistem defekti olan veya immun sistem defekti yaratılan hastaların takip edildiği servislerde görülen enfeksiyonlarda özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* gibi Enterobacteriaceae üyesi mikroorganizmalar, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*' en sık izole edilen ve tedavi başarısızlıkları yaşanan Gram-negatif bakterilerdir.

Klinik öneme sahip Gram-negatif bakteriler arasında, tüm dünyada, beta laktam antibiyotiklere karşı hızla yayılan direnç, direncin fenotipi kadar genotipi ve genetik mekanizmalarının da sorgulanmasına ve daha duyarlı moleküler sürveyans çalışmalarının yapılmasına sebep olmuştur. Elde edilen direnç sürveyans sonuçları yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve/veya mevcut protokollerinde gözden

geçirilerek ıslah edilmesine yardımcı olacak, dirençli suşların kaynakları ve bulaş yollarının tespiti kontrol çalışmalarına da rehberlik edecektir¹.

Klinik öneme sahip Gram-negatif bakterilerin çoğunda; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemleri hidrolize edebilen çok sayıda beta-laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Yapısal olarak dört gruba ayrılan beta-laktamazlardan A, C ve D grubu enzimlerin aktif bölgelerinde serin aminoasidi; B grubu enzimlerin aktif bölgelerinde ise bir veya iki çinko (Zn^{+2}) iyonu yer alır. Zn^{+2} iyonu taşıyan bu metalloenzimler, monobaktamlar dışındaki tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğine sahiptirler. Diğer antibiyotik gruplarının çoğuna dirençli bakterilerle oluşan ciddi enfeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek olan karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde de MBL önemli yer tutmaktadır².

Karbapenemazlar daha geniş spektrumda antibiyotik direncine sebep olan bir beta-laktamaz türüdür. Ambler sınıf B'de yer alan MBL olarak da bilinen, karbapenemazlar özellikle E coli ve klebsiella suşları arasında oldukça yaygındır. Bu enzimler monobaktam dışındaki bütün beta-laktamları hidrolize ederler. Hastanelerde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL), İndüklenmiş Beta Laktamazlar (İBL) ve MBL üreten suşlar ile enfekte hastaların tedavi protokollerinin optimize edilebilmesi için etken patojendeki beta laktamazın türünün bilinmesi şarttır³.

Ülkemizde MBL enzim üreten Gram-negatif bakteriler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Toplumdaki MBL' ların varlığını ve sıklığını tespit edebilmek ve direnç gelişiminin en aza indirilerek geciktirilmesi için daha fazla sayıda araştırma yapılmalıdır. Bu araştırmalar sayesinde ülkemizdeki MBL' ların varlığı ve coğrafik dağılımı açısından ayrıntılı bir epidemiyolojik bilgi edinilebilir. Bu bilgiler doğrultusunda dirençli suşlar kontrol altına alınarak tedavi stratejisinde farklı sağlık politikaları uygulanarak yeni direnç gelişimi minimize edilebilir.

Bu çalışmada tedavide büyük problemlere yol açan MBL pozitif izolatların bölgesel epidemiyolojisinin anlaşılması ve karbapenemaz enzimlerinin tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ç.Ü. Balcalı Hastanesi'nde tedavi gören hastaların klinik örneklerinden izole edilen Gram-negatif bakterilerde MBL' ların varlığı, sıklığı, tipleri araştırılmış ve toplum veya hastane kökenli suşlarda direncin dağılımını aydınlatmak için filogenetik analizi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Gram-negatif bakteriler tüm dünyada hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların önde gelen etkenleri arasında yer almaktadır. Hücre duvarlarındaki dış membran yapısına bağlı olarak Gram-pozitif bakterilere kıyasla birçok antibiyotiğe dirençli olan bu mikroorganizmaların hastane ortamında genetik madde aktarımı ve/veya antibiyotiklerin seçici baskısı ile multiple direnç özelliği kazanması, enfeksiyonların tedavisinde problem yaratmaktadır. Özellikle YBÜ’de takip edilen hastalarda dirençli suşlar ile oluşan enfeksiyonlar daha mortal seyretmektedir. Bu bağlamda hastanede verilen hizmet esnasında bulaşan enfeksiyonlara sık sebep olması ve direnç enzimlerini kodlayan genlerin kolay transfer edilebilmesi sebebi ile Enterobacteriaceae türleri ve *Acinetobacter*, *Pseudomonas* gibi nonfermantatif bakteriler oldukça önemlidir^{4,5,6}.

Enterobacteriaceae türleri insan da dahil tüm sıcak ve soğuk kanlı hayvan türlerinin barsak floraları başta olmak üzere doğada oldukça geniş bir hayat alanına sahiptir. Florada sıklıkla kommensal olarak yer alan Enterobacteriaceae türleri ekstraintestinal kolonizasyonlarda özellikle diyabetli, immün yetmezliği olan, immunosupressif ilaç kullanan, kanserli, invaziv enstrüman kullananlar ve ileri yaşlılar gibi enfeksiyonlara duyarlı kişilerde primer veya sekonder patojen olarak birçok enfeksiyona sebep olurlar. Özellikle hastanelerde verilen hizmet esnasında kazanılan enfeksiyonlarda *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella*’lar olmak sıklıkla izole edilmektedir^{7,8,9,10}.

Non-fermantatif Gram-negatif bakteriler ise doğada yaygın olarak bulunan, sağlıklı kişilerde nadiren enfeksiyona yol açan, genellikle hastanelerde verilen hizmet esnasında kazanılan enfeksiyonu ile ilişkili patojenlerdir. Hastane ortamında ventilatörler ile aksesuarlarından, hasta yatakları ve diğer gereçlerin yanı sıra hastane çalışanlarının cildinden de izole edilebilirler. *Acinetobacter* ve *P. aeruginosa* türleri klinik önemi olan nonfermantatif Gram-negatif bakteriler arasında ön sıralarda yer almaktadır. Giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde zorluklar bulunmaktadır¹¹.

P.aeruginosa, özellikle insanlarda oluşturdukları enfeksiyonlarının sıklığı ve çeşitliliği ile yüksek mortalite ve morbidite oranlarına neden olan önemli bir fırsatçı patojen olarak bilinmektedir. Özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün

yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olan önemli bir patojendir. *P.aeruginosa*' da, ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ve beta-laktamaz enzimleri ile pek çok antibiyotiğe karşı doğal direnç bulunmaktadır, Günümüzde geniş spektrumlu pek çok antibiyotiğin yaygın kullanımına bağlı olarak *P. aeruginosa*' da yüksek oranda antibiyotik direnci gelişmekte ve etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Multiple ilaç direnci taşıyan *P.aeruginosa*' nın, aminoglikozitler, kinolonlara ve karbapenemler dahil beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna karşı doğal direnç göstermesinin yanı sıra, özellikle karbapenemlere karşıda karbapenemazlar ile direnç kazanmışlardır.¹². Yapılan bir çalışmada MBL pozitif *P. aeruginosa*'nın klinik örnekten ilk izolasyonundan 6-12 ay sonra hastane çevrelerinden izole edilebildiği gösterilmiştir. MBL genlerini taşıyan integronlar veya ek gen kasetlerini de barındırabilen bu bakteriler dikkate alınmalıdırlar çünkü aynı hastanın diğer vücut bölgelerine veya yakınındaki diğer hastalara bulaşma riski taşırlar. Dolayısıyla MBL üreten suşların erken tanımlanması uygun tedavi protokollerini belirlemek ve çoklu direncin yayılmasını önlemek için gereklidir¹³.

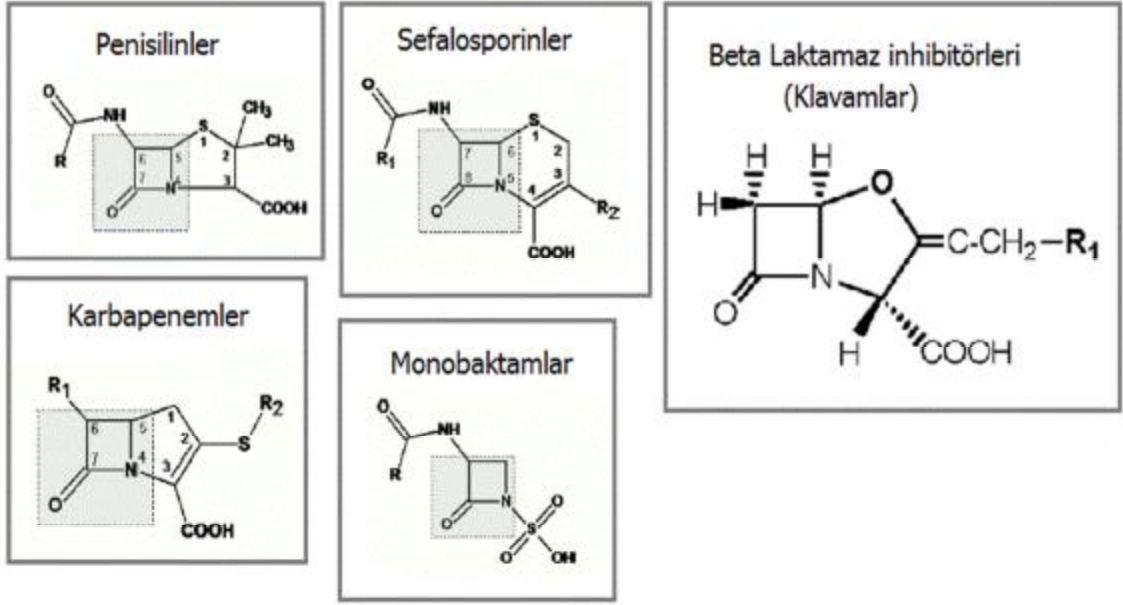
Düşük virülanslı ve fırsatçı patojen olarak bilenen *Acinetobacter* cinsi bakteriler günümüzde hastane patojenleri arasında önde gelen ve sorunlu mikroorganizmalar olarak son yıllarda özellikle klinik önemleri giderek artmaktadır. Bakterinin çevre koşullarına uyum sağlama yeteneği, yaygın kontrolsüz antibiyotik kullanımı, yoğun bakım ve invaziv enstrüman kullanımındaki artış, giderek artan oranda izole edilmelerine ve hastanelerde verilen hizmet esnasında kazanılan enfeksiyon salgılarına yol açmalarına sebep olmaktadır. *Acinetobacter* türleri özellikle vücudun nemli bölgeleri başta olmak üzere normal deri florasında yer alabilmektedirler. Normal bireylerin yaklaşık %25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları gösterilmiştir. Hastanede izlenen hastalarda taşıyıcılık oranı daha yüksektir. Bunun nedeni çapraz kontaminasyon ve hastane ortamının kaynak oluşturmalarıdır. *Acinetobacter* türleri çeşitli sınıf antibiyotiklere çok hızlı bir şekilde direnç geliştirmektedir. Bugün *Acinetobacter* izolatları sıklıkla kullanılan aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler aminoglikozitler gibi antibiyotiklerin büyük kısmına yüksek oranda direnç

göstermektedir. Seftazidim, sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler, imipenem, tobramisin, amikasin ve florokinolonlara karşı duyarlılık halen değişik oranlarda devam etmektedir. Acinetobacter suşlarında beta laktam antibiyotiklere direnç en sık kromozom ve plazmidler tarafından kodlanan beta laktamazların varlığına bağlıdır. Bunun yanı sıra dış membran geçirgenliğinin azalması PBP' lerin afinitesinde azalma da beta laktam antibiyotik direncine yol açmaktadır^{14,15}.

2.1. Beta Laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler günümüzde en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedir. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren düşük toksisiteli β -laktam antibiyotiklerde biri azot, üçü karbon olan dört üyeli β -laktam halkası bulunur. Monobaktamlar hariç bu ana halkaya 6-aminopenisilanik asid (6-APA) adı verilen ikinci bir halka eklenmiştir. Günümüzde, 6-APA molekülüne yan zincirler eklenmesi ile farklı moleküler yapı ve etkinlikteki 5 ana grup β -laktam antibiyotik elde edilmiştir^{16,17,18}.

- 1- Penisilinler
- 2- Sefalosporinler
- 3- Monobaktamlar
- 4- Karbapenemler
- 5- B-laktamaz inhibitörlüleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam)



Şekil 1. B-laktam halkasına göre antibiyotikler

2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta laktam antibiyotikler hücre zarları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu olan transpeptidazlar veya penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olarak tanımlanan proteinleri bağlayarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler¹⁹.

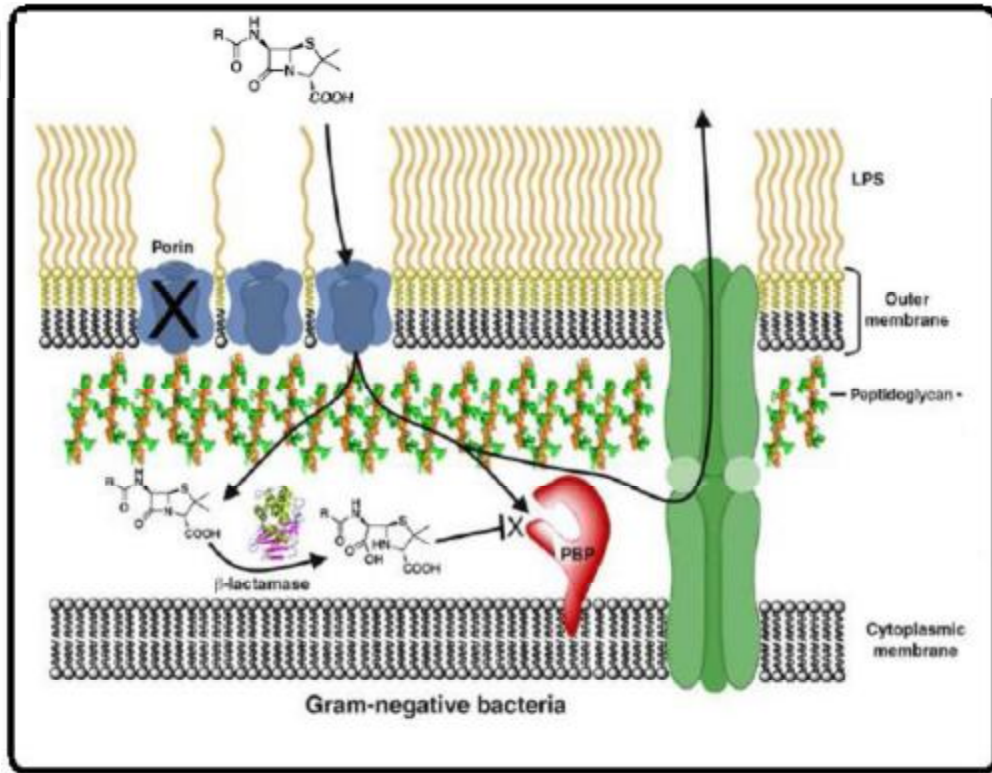
Peptidoglikan tabaka, bakteri hücre duvarının asıl polimeridir ve hücre duvarına şeklini verecek iç ve dış ortamdan kaynaklanan yaklaşık %20 sükröz konsantrasyonuna denk ozmotik basınca karşı bakteri bütünlüğünü korur. Beta laktamlar pentapeptid yan zincirdeki köprüyü bağlayan D-alanyl-D-alanine transpeptidase aktivitesini, enzimin aktif serin tarafındaki hidroksil grubunda, stabil esterler oluşturacak şekilde açilleyerek inhibe etmektedir²⁰.

Bu durumda bakteri hücre duvarındaki kros bağlanma sağlanmamakta ve ozmotik direnç kaybı ve lizis ortaya çıkmaktadır. Beta laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için Gram-negatif bakterilerde porin (outer membrane protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazma zarı ile dış zar arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir. Gram-pozitif bakterilerde ise dış zar bulunmayıp, sitoplazma zarının üzerinde kalın bir peptidoglikan tabakası uzanmaktadır.

Beta laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadır²¹.

2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması

Günümüzde yüksek etkinlik, düşük maliyet, minimal yan etki ve kolay alım nedeniyle sık kullanılan Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç son yıllarda gittikçe artmaktadır. Gram-negatif bakterilerde Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2. Gram-negatif bakterilerde direnç mekanizmaları

2.3.1. İlacın hedef bölgesi olan PBP’lerde meydana gelen değişiklikler

Antibiyotiğin hedef bölgesi olan PBP’lerde meydana gelen değişiklikler kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. PBP’nin beta laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması yoluyla, PBP sayısında azalma olması veya beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP’in sentezlenmesi yollarıyla olur.

Bakterilerde iki grup PBP belirlenmiştir. Birincisi, düşük molekül ağırlıklı PBP (DD-karboksiptidazlar), ikincisi de yüksek molekül ağırlıklı PBP'dir (transpeptidaz ve transglikozidos'lar). Yüksek molekül ağırlıklı PBP'deki değişikliğe bağlı oluşan penisilin direnci Gram-pozitiflerde Gram-negatiflerden daha fazladır²².

2.3.2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması

Dış membranının geçirgenliğinin azalması özellikle Gram-negatif bakteriler için önem taşır. Gram-negatif bakterilerin membranları Gram-pozitif bakteri membranlarına nazaran daha komplike bir yapıya sahiptir. Gram-negatif bakterilerin dış membranı "Outer Membran" (OM) fosfolipid ve lipopolisakkaritden oluşan iki tabakalı bir yapıdır. OM çok sayıda porin proteinleri vardır. Murein lipoproteini (Lpp), OmpA ve genel difüzyon porin proteinleri gibi porinler her hücrede yaklaşık >105 kopya olarak bulunur. Fosfolipid ve lipopolisakkarit yapıda meydana gelen mutasyonlar OM sayısında azalma ile sonuçlanır. OM aynı zamanda seçici bariyer özelliğinde bir kanal gibi rol oynar ve içlerinden geçecek molekülün iyon yükü ve büyüklüğü yönünden seçicilik gösterirler. Bu nedenlere bağlı olarak antibiyotik reseptörlere ulaşamamakta ve etkisini gösterememektedir. Bu özellik Gram-negatif bakterilerin antibiyotiklerle olan etkileşiminde önemlidir^{23,24}.

Bakterilerde antibiyotiklere karşı dirençte OM'da iki temel değişiklik ortaya çıkar. Birincisi spesifik mutasyonlar ile dış membranda permeabilite azalması şeklinde fonksiyonel değişiklikler, ikincisi ise porinlerde sayıca azalma ya da porin kaybının neden olduğu değişikliklerdir²⁵.

E. coli ile ilgili yapılmış çalışmalarda iki majör porin; OmpK35 ve OmpK36'nın üretildiği tespit edilmiştir. GSBL üreten izolatlarda her iki porin kaybı sefoksitin direnci, geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç artışı ve özellikle ertapenem olmak üzere karbapenemlere duyarlılık azalmasına neden olur. Porin kaybı aynı zamanda GSBL üreten izolatlarda florokinolon gibi beta laktam dışı antibiyotiklere dirençten sorumlu mekanizmalar arasındadır^{26,27}.

2.3.3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak beta-laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran, penisilinler, sefalosporinler ve

benzeri beta laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Beta laktam antibiyotiklere karşı klinikte en çok gözlenen direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar; Gram-pozitif, Gram-negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir²⁸. Gram-pozitif bakteriler arasında beta laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Anaeroblardan Clostridium ve Fusobacterium'ların beta-laktamazları esas olarak penisilini parçalarken Bacteriodes'ler tarafından üretilen beta-laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinaz etkinliği göstermektedir. Gram-negatif bakteriler, daha çok sayıda beta-laktamaz üretirler. Başta Enterobacteriaceae üyeleri olmak üzere Gram-negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir²⁹.

2.3.4. Eflüks (Atım) Pompası

Antimikrobiyal dirençte diğer neden ise antibiyotiklerin hücre dışına atılmasında kullanılan pompa sistemleridir. Atım pompaları “ATP-binding cassette” (ABC) süper ailesi, “Major facilitator” süper ailesi (MFS), “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) ailesi, “small multidrug resistance” (SMR) ilaçların alt gruplarını ve metabolitlerini transport eden süper aile ve “Resistance-nodulation division” (RND) süper ailesi olmak üzere beş gruba ayrılır. Genellikle kromozomal olarak kodlanmakla birlikte plazmid aracılığı ile de kodlanabilir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler farklı pompa sistemleri bulundurmaktadır. Pompalar seçicidir ve geniş substrat özgüllüğü vardır. Çoğunlukla sitoplazmik zar da bulunmaktadır ve ilacın atımı için proton itici güç kullanılmaktadır. Gram-negatiflerde özellikle RND pompa sistemi ilaç direncinde önemli role sahiptir. RND pompa ailesinden AcrAB-TolC (florokinolon ve sefuroksim direnci ile ilişkili bulunmuştur), MFS pompa ailesinden MdfA ve yeni bulunan QepA (plazmid ile kodlanan florokinolon direnç geni) , SMR pompa ailesinden EmrE E. coli'de bulunan pompa sistemleridir^{25,30}.

2.4. Beta-Laktamazlar

Beta laktamaz enzimleri beta-laktam antibiyotiklerdeki dört üyeli beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Bu enzimler Gram-negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı

geliştirdiği major defans mekanizmalarından biridir. Beta laktamazlar ilk olarak penisilinleri hidroliz etmeleriyle tanımlanmıştır. Bundan sonra her yeni beta-laktam grubu antibiyotik kullanılmasıyla bu tabloya yeni beta laktamazlar eklenmiştir. Abraham ve Chain'nin 1940 yılında penisilinazı ortaya koymalarından bugüne kadar 890'a yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Ambler 1980 yılında amino asit dizilerine dayanarak β -laktamazları A,B,C ve D olmak üzere dört grupta toplamıştır^{31,32}.

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

Sınıf B: Aktive gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metalloenzimlerdir.

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

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios tarafından biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta-laktamazları 4 gruba ayırdıkları sınıflandırmadır³³. Bu grupların genel özellikleri tablo 1' de görölmektedir³⁴.

Tablo 1. Beta-laktamazların sınıflandırılması

Fonksiyonel Mekanizma	Ambler (sınıf)	Bush (grup)	Örnekler	Substratlar
Serin betalaktamazlar	Sınıf A penisilinazlar	(2a, 2b, 2c)	Geniş spektrumlu betalaktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzilpenisilin, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler (sefazolin, sefuroksim)
		(2be)	Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL): TEM ailesi ve SHV ailesi Diğerleri: BES1, GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO1, TLA-1, VEB-1/2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin oksasilin TEM ve SHV ailesi ile aynı
		(2br)	TEM ailesi (TEM-30, TEM-31)	TEM ve SHV ailesi ile aynı ve inhibitörlere dirençli
		(2e)	CTX ailesi	Geniş spektrumlu betalaktamazlar ile aynı, bazı enzimler için sefepim
		(2f)	Karbapenemazlar (KPC1, KPC-2, KPC-3 ve GES-1, GES-2)	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten karbapenemler, sefamisinler
Metallobetalaktamazlar	Sınıf B metallobetalaktamaz (Çinko)	(3a, 3b, 3c)	Karbapenemazlar: IMPailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2, GIM-1 ve L-1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A ile Aynı
Serin betalaktamazlar	Sınıf C sefalosporinaz	(1)	AmpC tip: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten sefamisinler
Serin betalaktamazlar	Sınıf D kloksasilin hidrolize edici enzimler (OXA)	(2d)	OXA ailesinin çoğu	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin, oksasilin.
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 ile Aynı
Bilinmiyor		(4)	AVS-1	Herhangi bir moleküler veya fonksiyonel gruba uymayan, sekanslanamamış ya da özellikleri tanımlanamamış enzimler

2.4.1. Grup 1 Kromozomal Beta Laktamazlar

Grup 1 Kromozomal Beta Laktamazlar sefalosporinazlardır. Bu enzimlerin moleküler sınıfı 'C'dir. Salmonella dışında hemen tüm Gram-negatif bakterilerde kromozom kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlar bulunur. Ancak miktar, sentez yolu ve dirençteki rolleri açısından farklılıklar gösterir. Enzimler, indüklenebilen enzimler ve yapısal enzimler olarak bulunabilmekte ve yüksek düzeyde veya düşük düzeyde olabilmektedir. *E.coli*, *P.mirabilis* ve *Shigella spp.*de düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır ve miktarları ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmaya kadar düşük düzeydedir. Buna karşın *E.coli*, izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir.

İndüklenebilir kromozomal enzimler klinikte sık karşılaşılan Gram-negatif bakterilerde bulunur. *Enterobacter spp.*, *P.aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'deki sentezlenen kromozomal beta laktamazlar indüklenebilen türdedir. *E.coli*'de bu enzimi kodlayan genler olmasına rağmen promotör bölge aktif olmadığından indüklenme özelliği yoktur. *Citrobacter freundii* ve *Morganella morganii*'de İndüklenebilir beta-laktamaz (İBL) taşıyan genler plazmid üzerinde gösterilmiştir. Plazmidler ile taşınabilir hale gelmesi bu direncin bu enzimi kodlayan genleri taşımayan *Salmonella spp.* ve *K.pneumoniae* gibi bakterilere de yayılmasına neden olmuştur.

Klonlama çalışmaları, kromozomal tip -1 beta laktamaz indüksiyonunda, AmpR, AmpC ve AmpD olarak adlandırılan 3 genin rol oynadığını göstermiştir. Bu genler Enterobacteriaceae ailesinin tüm üyelerinde bulunmaz; örneğin *E.coli*'de AmpC ve AmpD genleri vardır, ancak AmpR kaybolmuştur. Plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazının aşırı salgılanması porin kaybı ile birlikte görüldüğünde karbapenem direncine neden olmaktadır. Yirmiden fazla AmpC sınıfı beta laktamaz tanımlanmış olup bunlardan 5'i (DHA-1, DHA-2, ACT-1, CMY-13 ve CFE-1) indüklenebilir özelliktedir.

AmpC türü beta laktamaz üreten bakteriler geniş spektrumlu sefalosporinlerin yanı sıra sefoksitine ve beta-laktamaz inhibitörlerine de (klavulanik asit ve sulbaktam) dirençlidir. Buna karşın aztreonam, kloksasilin ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı duyarlıdırlar. Tüm beta-laktam antibiyotikler beta-laktamaz üretimini

indükleyebilir ancak imipenem, klavulanik asit ve kombinasyonları, sefoksitin vesefotetan güçlü indükleyicidirler. Plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamazların indüklenme özelliği yoktur. Normalde, bakteri tarafından beta laktamazlar bir represör mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir. Farklı beta laktam antibiyotikler değişik oranlarda olmak üzere Grup 1 beta laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici yani beta laktamın ortadan kalkmasıyla beraber tekrar eski bazal beta laktamaz sentezine geri döner. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir direnç söz konusu olmaz³⁴.

2.4.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta Laktamazlar

Plazmid kontrolündeki beta laktamazlar en geniş kategoriyi oluşturmakta olup, A ve D molekül sınıfını içermektedirler. Bu beta laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbapenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar. Bunların en büyük grubu türler arasında kolayca yayılabilen geniş spektrumlu beta laktamazlardır. Gram-negatif bakterilerde gözlenen beta laktam antibiyotiklere karşı direnç büyük oranda plazmid kontrolündeki beta laktamazlara bağlıdır. Moleküler sınıf A'da olan ve 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeni ile klinik açıdan önem taşımaktadırlar. Grup 2b'de yer alan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 'geniş spektrumlu' enzimlerdir. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2, SHV-1 beta laktamazları Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunur. Bu beta laktamaz penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinleri etkin bir şekilde parçaladıkları halde geniş spektrumlu beta laktamazlara (yeni sefalosporinler, monobaktamlar) sınırlı etki gösterirler veya etkisizdirler. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar^{35,36}.

GSBL'ler TEM-3'den TEM-27'ye, SHV-2'den SHV-7'ye kadar numaralandırılmıştır. Moleküler sınıf D'de ve beta laktamaz sınıflandırılmasında 2d grubunda yer alan OXA grubu enzimlerin tercih ettikleri substrat kloksasilindir. OXA-10 enzimi, OXA-1'den OXA-10'a kadar olan OXA enzimlerine oranla daha geniş

spektrumlu bir enzimdir. Sefaperazona yüksek direnç oluşturmakta, eğer çok miktarda sentezlenirse aztreonam, sefotaksim ve seftriakson duyarlılıklarında azalmaya yolaçabilmektedir. Son yıllarda bu enzimlerin de genişlemiş spektrumlu mutantlarının çıktığı tespit edilmiştir. Aynı TEM ve SHV enzimlerinde olduğu gibi OXA enzimlerinin genlerinde oluşan mutasyonlar enzim molekülünde genellikle 1-4 amino asidin değişmesine, dolayısıyla farklı bir enzim molekülünün oluşmasına yol açar. Bu genişlemiş spektrumlu türevler (OXA-11,14-17) özellikle nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinde giderek önem kazanmaktadır.

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda GSBL enzimlerinin varlığı gösterilmiştir. 2f grubunda Enterobacteriaceae ve *Serratia marcescens*'in karbapenemleri hidrolize eden enzimleri bulunur. Bu mikroorganizmalar da son yıllarda hastane enfeksiyonlarında sık karşılaşılan etkenlerdir. Ayrıca *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris* ve *Bacteroides fragilis*'de plazmid kontrolünde bulunan beta laktamazlar tespit edilmiştir.

GSBL'ler, mikrobiyolojik olarak oksiiimino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Yapısal özellikler ve evölüsyon açısından GSBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır. GSBL'lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerir ve Ambler'in moleküler sınıflamasına göre A sınıfında yer alır. OXA grubu enzimler ise D moleküler sınıfında yer almaktadırlar. Beta laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasına göre ise GSBL'ler 2be, 2e ve 2d alt gruplarına ayrılmaktadır.

GSBL'ler oksiiimino sefalosporinler ve aztreonamın yanı sıra birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil penisilinleri de hidrolize uğrattır. Ancak bu enzimlerin sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin ve sefotetan) karşı etkisi yoktur. Sefamisinlere etkili olmamaları, GSBL'leri AmpC tipi beta laktamazlardan ayıran önemli karakteristik özellikleridir. Ancak yine de istisnai durumların söz konusu olabileceği unutulmamalıdır. Örneğin TEM 52'nin moksalakam ve sefotetanı hidrolize uğratabildiği gösterilmiştir. GSBL'lerin büyük çoğunluğu, özellikle de TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL

de mevcuttur. Günümüzde tüm beta laktamazlar içinde sayıları en hızla artan beta laktamaz gruplarının başında GSBL'ler gelmektedir.

Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri, GSBL etkisini bloke edebilmekle birlikte, GSBL'lerin sıklıkla plazmidler üzerinde kodlanmaları ve bu nedenle suşlar arasında kolaylıkla yayılmaları büyük sorun oluşturmaktadır. GSBL üreten klinik izolatları tespit etmek için çok sayıda metod önerilmektedir. GSBL taşıyan ajanlar ile oluşan enfeksiyonların yayılmasını önlemede ve tedavide en etkili ajan imipenem olarak görünmektedir³⁷.

2.4.2.1. Grup 2a

Penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bu alt grupta bulunmaktadır. *S. aureus*'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *B.cereus*'un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır³³.

2.4.2.2. Grup 2b

Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazları içerirler. Plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca OHİO-1 ve *H.influenzae*'da izole edilen ROB-1 enzimini de içermektedir. TEM-1 beta-laktamazı özellikle *E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer Enterobacteriaceae üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K.pneumoniae* suşlarında bulunur^{37,38}.

2.4.2.3. Grup 2be

Oksiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson,

sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM-ve SHV-enzimleri gelişmiştir³⁷. Bu enzimler 2be'de yer almakta ve ESBL (extended-spectrum beta-lactamase = genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar) olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye'de üretilen suşlarda tespit edilmiştir^{39,40}.

2.4.2.4. Grup 2br

Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu gruba alınmıştır. TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır³³.

2.4.2.5. Grup 2c

Grup 2c içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M.catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V.cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır³³.

2.4.2.6. Grup 2d

Kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta tanımlanmıştır⁴¹. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır³³.

2.4.2.7. Grup 2e

Grup 2e yer alan beta-laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B.fragilis*'in CepA enzimi, *B.uniformis* ve *B.vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E.coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S.maltophilia*'nın L2 ve *Y.enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır³³.

2.4.2.8. Grup 2f

E.cloacae'nın indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E.cloacae*'nın kromozomal NMC-A enzimi ve *S.marcescens*'in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadırlar³³.

2.4.3. Grup 3 Beta Laktamazlar (Metallo-β-Laktamazlar)

MBL, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B'de yer alan ve diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir⁴².

MBL gerek yapısal olarak gerekse fonksiyonel olarak diğer beta laktamazlardan farklıdır. Klinik suşlarda genellikle ikinci veya üçüncü bir beta laktamaz enzimi ile birlikte salınması, diğer beta laktamazlardan bir başka farkıdır. Yapısal farklılıkları aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurmalarından kaynaklanmaktadır. İşlevsel farklılıkları ise monobaktamlar için zayıf hidrolitik kapasiteleri olması ve klavulanik asitle veya tazobaktamla inhibe olmamalarından kaynaklanmaktadır. Beta laktamaz inhibitörleri yerine EDTA, dipikolinik asit ya da 1,10-fenantrolin gibi metal şelatörlerle inhibe olmaktadırlar^{43,44,45,46,47,48}.

Ciddiye alınmayan klinik patojenlerden biri olan *B.cereus*'ta çinko bağımlı ilk MBL 1960'ların ortalarında tanımlanmış, ikinci çinko bağımlı penisilinaz ise 1980'lerin başında *S.maltophilia*'da gösterilmiştir. Kısa süre sonra imipenem hidrolizi yapan MBL'lar *A.hydrophilia* ve *B.fragilis*'ten tanımlanmıştır. Önceleri bu grupta sadece kromozomal enzimlerin varlığı bilinirken, 1991'de Japonya' da *S.marcescens* ve *P.aeruginosa* suşlarında plazmid kökenli bir MBL'in (IMP-1) tespit edilmesi, karbapenemlerin geleceği konusunda endişe doğurmuştur. Nitekim geçen süre içinde integron kökenli IMP (IMP-1-18) ve VIM (VIM-1-13) ailesi üyeleri Avrupa ülkelerinde de giderek artan oranlarda bildirilmeye başlanmıştır. Aralarında küçük yapısal benzerlikler bulunan 2 majör enzim grubu tanımlanmıştır. Birinci grupta; geniş substrat özgüllüğü gösteren, monobaktamlar dışındaki tüm beta-laktamları hidroliz eden enzimler bulunur. İkinci grupta; "gerçek karbapenemaz" lardan oluşur. Primer olarak *Aeromonas* türlerinde bulunan bu grup enzimler penisilin ve sefalosporinlere zayıf hidrolitik etki gösterir. Şimdiye kadar, Karbapenem dirençli suşların yalnızca küçük bir kısmında MBL varlığı tanımlanmıştır. Muhtemelen bu durumun sebebi, karbapenem

direncinin, permeabilite değişiklikleri ve kromozomal sefalosporinazların üretiminde artış gibi daha kolay yollarla kazanılabilmektedir. Ancak Japonya’da MBL’ların plazmidler üzerinde gösterilmesi önemli bir sorunu ortaya çıkarmıştır. Plazmid aracılı karbapenem direncinin artışını sürdüreceği ve belki de bu ajanların kullanımını sınırlayabileceği tahmin edilmektedir^{44,49}. MBL’lar sıklıkla etki spektrumlarını genişletecek bir diğer enzimle birlikte üretilirler. Örneğin, alt grup 3b genellikle grup 2b’deki penisilinazlarla birlikte üretilir. *S.maltophilia*’da ise L1 ile birlikte GSBL niteliği taşıyan L2 üretilmektedir. Böylelikle *S.maltophilia* suşları normalde MBL’ların etki etmediği aztreonama da direnç göstermektedir. MBL’lar aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu taşıdıklarından tanımlanmalarında bu çinko iyonuna bağlanarak enzimi inaktive eden EDTA, 2-merkaptopropionik asit (MPA) gibi bileşikler kullanılmaktadır⁵⁰. Hastane salgınları açısından önemli bakteri türlerinde bulundukları için tanımlanmaları enfeksiyon kontrolü açısından önemlidir. MBL’ların en önemli özelliği karbapenemleri hidroliz edebilme yetenekleri olmasına karşın bazıları aynı zamanda çoğu beta-laktam grubunu da hidroliz edebilecek kapasitededir. Dolayısıyla, MBL üreten organizmalar söz konusu olduğunda beta-laktam antibiyotiklerin kullanılabilirliği ciddi olarak sınırlanmış durumdadır⁴⁹.

2.4.4. MBL’ların sınıflandırılması

MBL’lar 1995’te Bush ve arkadaşları tarafından “fonksiyonel grup 3” içinde sınıflandırılmıştır. Bu enzimlerin majör ayırt edici özellikleri metal iyon şelatörleri tarafından inhibe edilmesi ve klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam gibi ticari olarak elde edilebilen inhibitörlerden etkilenmemeleridir. İlk sınıflandırmanın yapıldığı sıralarda substrat profillerine göre bu enzimlerin subgruplara ayrılması söz konusu olmamıştır. Ancak ilerleyen yıllarda literatürde tanımlanan MBL sayısı arttıkça enzimlerin substrat özelliklerine göre alt gruplara ayrılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Rasmussen ve Bush tarafından 3 fonksiyonel grup MBL tanımlanmıştır⁴⁹.

Grup 3a

Bu enzimler, genellikle penisilinleri imipenemden daha hızlı (en az %60) olarak hidrolize edebilirler. Sefalosporinler de, imipenem kadar olmasa da bu enzimler tarafından güçlü bir şekilde hidrolize edilir. Maksimum aktivite için çinko eklenmesini

gerektirirler veya bu +2 değerlikli katyon tarafından aktive olurlar. Bu da çinko için düşük bağlanma affinitesi anlamına gelir⁵¹. Bu grup içerisinde *B.cereus* II, *B.fragilis*'in CcrA, *B.cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *Chryseobacterium indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un BlaB enzimleri yanı sıra *S.marcescens*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.flexneri*, *K.pneumoniae* gibi değişik türlerde tanımlanan IMP-1-18 ve VIM-1-13 enzimleri yer almaktadır⁴⁹. Subgrup 3a enzimleri çok geniş aralıkta çok çeşitli substratları tanıyabilir. Bu da onların çok çeşitli beta-laktam içeren ajanlara karşı tehdit oluşturmalarına neden olur. Bu enzimlerin tümü penisilinleri hidroliz eder. Sefalosporinler genellikle imipenemden daha yavaş hidrolize olurlar. Katalitik çinko ilavesine ek olarak grup 3a enzimleri, maximum katalitik aktivite için suplemental iki değerlikli çinkoya ihtiyaç duyar⁵¹.

Grup 3b

Aeromonas türlerinin metallo enzimlerini kapsar ve bunlara “gerçek karbapenemazlar” da denir. Bu enzimlerin karbapenemlere yüksek özgülüğü bulunmaktadır. Karbapenemler dışındaki beta-laktamlara etkileri çok az olduğundan varlıkları nitrosefin hidrolizine dayanan testlerle gösterilemez. Bu enzimleri grup 3a MBL'larından ayıran bir diğer özellik, çinko ilavesinin aktif enzim üzerindeki etkisidir. Tüm MBL'ların aktif bölgelerinde çinko bulunduğu ve enzimin katalitik aktivitesi için bu katyonun mutlaka ortamda bulunması gerektiği kabul edilmektedir. Bununla birlikte, grup 3b enzimlerinden en az 3 tanesi düşük çinko konsantrasyonları ile inhibe olur⁴⁹.

Aeromonas spp. enzimlerinin nitrosefini çok zayıf hidrolize etmesi nedeniyle bu karbapenemazlar yakın geçmişe kadar tanınamamıştır, varlıkları izoelektrik odaklama jellerinde tespit edilememiştir. Bu subgrubu tespit edebilmek için jel içinde karbapenem substrat olarak kullanılmalıdır. Grup 3b'deki bütün enzimler EDTA ile inhibe olur. Bu da aktif bölge metal iyonunun şelasyonunu gösterir. EDTA eklenmesinden sonra çinko eklemenin enzimlerin çoğunun aktivitesini geri kazandırdığı gösterilmiştir. Grup 3b enzimleri için imipenem açısından yüksek katalitik etkinlik bildirilmiş, fakat benzil penisilin veya sefaloridin için düşük veya zayıf hidroliz gözlenmiştir⁵¹.

Grup 3c

Legionella gormanii'nin MBL'ı sadece bu grupta yer almaktadır. Bu enzim literatürde bir kez tanımlanmıştır. Yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılmaktadır. Diğer grup 3 enzimlerinden farklı biyokimyasal özellikler taşımaktadır⁴⁹. Bu enzim, geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidroliz etmesiyle ayrılır. İleri değerlendirmeler sonucunda bu enzimin grup 3a enzimiyle yakın ilişkili olabileceği gösterilebilir⁵¹. Subgrup 3a enzim üreten organizmaların çoğu beta-laktam antibiyotiklerle olan saldırıya karşı koyabilmesine rağmen grup 3b enzimleri sadece karbapenemler değil daha geniş substrat profiline sahip beta-laktamazlarla birlikte üretilmeye gerek duyarlar⁵².

Günümüze kadar bildirilmiş olan beş ayrı MBL türü bulunmaktadır. Bunlar IMP(Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (SaoPaulo Imipenemase), GIM-1(German Imipenemase) ve SIM-1 (Seul Imipenemase) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IMP ve VIM tipleri en sık rastlananlardır ve dünya çapında yaygındırlar. SPM-1 Güney Amerika'da (Brezilya) yaygındır ve henüz başka bölgelerden bildirilmemiştir. GIM-1 ve SIM-1 ise yalnız birer suşta tanımlanmıştır⁵³.

IMP: IMP-1 enzimi Japonya'da 1992-1994 yılları arasında Karbapenem dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında gösterilmiştir. Önceleri sadece kromozomal olarak kodlandığı düşünülen bu enzimin *blaIMP-1* geninin plazmid ve integrona yerleşik olduğu tespit edilmiş ve direncin aktarılabilir olması nedeniyle kaygılara yol açmıştır⁵⁴. IMP tipi MBL üreten bakteriler önemli bir tehlike olarak görülmektedir. IMP-1 enzimini kodlayan *blaIMP-1* geni pozitif olan *P. aeruginosa* suşlarıyla yapılan bir çalışmadaki enfeksiyona bağlı ölüm oranı, *blaIMP-1* negatif izolatların enfeksiyonlarına göre anlamlı derecede daha yüksek olarak bulunmuştur⁵⁵.

VIM: Transfer olabilen MBL'ler içinde diğer önemli grup VIM benzeri enzimlerdir. VIM-1 enzimi ilk defa 1997 yılında İtalya'nın Verona kentinde bir *P. aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir. Enzimin Verona kentinde bulunması ve imipeneme dirençli olması nedeniyle enzime VIM-1 adı verilmiştir⁵⁶. VIM benzeri enzimlerden biri olan VIM-2 enzimi ilk kez 1996 yılında Fransa'da nötrofenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir. Bu

izolatın seftazidim, sefepim ve imipenemin de içinde bulunduğu pek çok beta-laktam ajana dirençli olduğu belirlenmiştir⁵⁷.

SPM: Brezilya’da 1997 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanan SPM-1 enziminin, o güne kadar tanımlanan MBL’lardan tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. Enzimi taşıyan izolatın kolistin dışında Gram-negatif bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olduğu görülmüştür⁵⁸. *bla*SPM-1 geni transpozon veya integronlar içinde yer almayıp sadece plazmidde bulunmaktadır⁵⁹.

GIM: Almanya’da 2002 yılında farklı hastalara ait *P. aeruginosa* izolatlarında tespit edilen GIM-1 enziminin, IMP ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir⁶⁰.

2.5. Beta Laktamazların Tespiti

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının, önerilen standart yöntemlerle araştırılması ve direnç oranlarının güvenilir ve çabuk tespit edilmesi son derece önemlidir.

2.5.1. GSBL tanı yöntemleri

GSBL tanımlanmasında Şekil 3 ’de belirtildiği üzere CLSI’ya göre disk difüzyon ya da dilüsyon yöntemleriyle bir ön tarama olarak rutin antibiyogramlarda seftazidim, sefotaksim, seftriakson sefpodoksim ve/veya aztreonam direnci ve sefoksitin duyarlılığı aranmalıdır. Çünkü bu patern GSBL için bir gösterge niteliğindedir. 2. aşama olarak GSBL’lerin klavulanik asitle inhibe olma özelliğinden yararlanılır. Bu özelliği GSBL tespitinde kullanmak üzere farklı yöntemler denenebilir⁶¹.

Ön tarama olarak;

seftazidim ≤ 22 ,

sefotaksim ≤ 27 ,

seftriakson ≤ 25 ,

sefpodoksim ≤ 17 ,

aztreonam ≤ 27 direnci;

Klavulanik asitle inhibisyon özelliğine dayanan testlerden birisi yapılmalı

Çift disk sinerji testi

Kombine disk yöntemi

Klavulanik asit kombinasyonlu MİK deneyi

E test

Otomatize Vitek Sistemi

Üç boyutlu test

Şekil 3. GSBL Testleri (*E.Coli* ve *Klebsiella spp* için)

Klinik mikrobiyoloji testleri genellikle klavulanat olmak üzere bir beta laktamaz inhibitörünü ve seftazidim veya sefotaksim gibi bir oksimino-sefalosporin kombinasyonunu kullanır. Bu testlerde klavulanat GSBL'yi inhibe eder ve sefalosporin dirençliliğinin düzeyini azaltır. Bu testlerden bazıları Kirby-Bauer disk difüzyon test yöntemi esasına dayandırılmıştır. Tanımlanan ilk tayin testi çift disk sinerji yöntemidir⁶². Mikroorganizma Müeller-Hinton agar plaklarına eküvyon ile yayılır. Amoksisilin-klavulanat içeren duyarlılık diski plağın merkezine konur. Oksimino beta-laktam antibiyotiklerden birini içeren diskler amoksisilin-klavulanat içeren diskten 3'er cm uzağa yerleştirilir. Oksimino beta-laktam diskinin çevresinde oluşan inhibisyon zonunda, amoksisilin-klavulanat diskindeki klavulanatın sinerjisi nedeniyle olan artış pozitif sonuç olarak kabul edilir.

Benzer bir test Jacoby ve Han tarafından tanımlanmıştır. Herhangi bir oksimino beta-laktam antibiyotik içeren duyarlılık disklerine 20 µg sulbaktam eklenmiştir. Sulbaktam içeren disklerin inhibisyon zonunda tek başına ilaç içeren disklere göre 5 mm'lik artış pozitif olarak kabul edilmiştir. Günümüzde CLSI başlangıç taraması olarak 1 µg/ml konsantrasyonda 5 adet geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerin birini içeren sıvı besiyerindeki üreme testini önermektedir. Pozitif sonuç GSBL varlığı için şüpheyi ortaya koyar. Birkaç ticari firma klinik laboratuvarında mevcut olan minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) test yöntemleri ile birlikte kullanılabilecek GSBL

testlerini geliştirmişlerdir. E-Test GSBL şeritleri (AB Biodisk, Sonla, İsveç) bir tarafında seftazidim ve diğeri tarafında seftazidim+klavulanat içeren iki taraflı şeritlerdir. GSBL için pozitif test klavulanik asit varlığında seftazidim MİK değeri 3 dilüsyondan fazla azalma ile ortaya konur.

Kombine Disk Yönteminde, sefotaksim ve seftazidim diskleri ile bu disklerle 10µg klavulanik asit eklenmesiyle oluşan diskler Müeller-Hinton agara ekilir. Bir gece inkübasyondan sonra diskler etrafındaki inhibisyon zon çapları karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha geniş ise izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir.

Otomatize mikrobiyal duyarlılık test sistemi olan Vitek (Biomérieux) seftazidim veya sefotaksim tek başına ve klavulanik asit ile birlikte kombinasyonu yöntemine dayanarak GSBL testi üretmiştir. Klavulanat içeren kuyucuklar, tek başına ilaç içeren kuyucuklarla karşılaştırıldığında önceden tahmin edilen üremedeki azalma miktarı GSBL varlığını göstermektedir.

GSBL tayini için öne sürülen bir diğeri yöntem Thomson ve Sanders tarafından tanımlanan üç boyutlu testtir. Bu testte Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine mikroorganizmanın inokülasyonunu takiben bir yarık açılır. Bu yarığın içine mikroorganizmanın sıvı besiyerindeki süspansiyonundan konulur. Bunu takiben antibiyotik diskleri bu yarıktan 3 mm uzaklıklara yerleştirilir. Beklenen dairesel inhibisyon zonlarında yapısal bozukluk veya devamlılığın olmaması pozitif test olarak kabul edilir. Bütün bu testlerin her biri değeri olmakla birlikte beta laktamaz fenotipine dayalı hiçbir test Gram-negatif bakterilerin klinik izolatlarında GSBL tayini için %100 özgül ve duyarlı değildir. Bir enzim ailesine ait beta-laktamazların varlığını tayin etmek için kullanılan en kolay ve yaygın moleküler yöntem beta-laktamaz genine özgül oligonükleotid primerlerinin kullanıldığı ‘polimeraz zincir reaksiyonu’ (PCR) dur^{63,64}.

2.5.2. Metallo-β-laktamaz enzimini tespit etme yöntemleri

CLSI tarafından MBL üreten mikroorganizmaların tespit edilmesi için bir yönerge bulunmamaktadır. Bu tür bakterileri tespit etmek için birkaç fenotipik yöntem vardır. Bu yöntemler EDTA, tiol temelli bileşiklerin MBL aktivitelerini inhibe etme yeteneğine dayanmaktadır. Bu testlerden EDTA’lı imipenem veya seftazidimli çift disk sinerji testi, seftazidim veya imipenemli 2-mercapto-propionik asit, EDTA’lı seftazidim

veya imipenem kombinasyonlu disk testi, MBL E testidir. Ayrıca PCR yöntemi de kullanılmıştır⁶⁵.

Günümüzde MBL'lerin tespiti için tanımlanan fenotipik yöntemler çift disk sinerji ve Hodge testi zor ve yorumlanması subjektiftir. Bu yöntemler teknik açıdan zaman alıcıdır. 2-mercaptopropionik asit toksiktir ve çalışma için özel önlemler gerekir. Rutinde bu yöntemlerin kullanımı uygun değildir⁵⁰. MBL üretimini tespit etmek için oldukça duyarlı basit bir fenotipik yöntem bildirilmiştir. Bu yöntem EDTA'lı imipenem kombine diskleri ile yapılmıştır. Duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur⁶³.

MBL inhibitörü olarak tanımlanan CuCl₂, FeCl₂, EDTA, Thiol Bileşikleri (mercaptoasetik asit, 2-mercaptopropionic acid, mercaptoethanol) IMP-1 inhibisyonu için kullanılıp, değerlendirilmiştir. Bu ajanların MBL'yi bloke ettiği raporlanmıştır⁶⁶.

2.5.2.1. Kombine disk yöntemi

Kombine disk yönteminde; bakterilerin 0.5 McFarland'a göre bulanıklığı ayarlanarak, serum fizyolojikle 1/10 oranında sulandırılmaları yapılır ve IsoSensitest agar yüzeyine ekilir. Zaman geçirmeden imipenem diski ve 0.1 M (292µg) EDTA çözeltisinden 10µL emdirilmiş boş disk merkezden merkeze 22 mm uzaklık olacak şekilde yerleştirilir. Plaklar bir gece 35°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedilir. İki disk arasındaki alanda inhibisyon zonunun varlığı MBL üretiminin pozitif olduğunu göstermektedir^{63,66}.

2.5.2.2. Modifiye Hodge testi

İmipenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5'in 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak MHA plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilir. Plağın merkezine ertapenem (10 µg) ya da meropenem (10 µg) diski yerleştirilir. Test edilecek suşlar, bu diskin dört bir kenarından periferde doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çarpıklık görülmesi veya yonca görünümü pozitif olarak kabul edilir⁵⁰.

2.5.2.3. E-test yöntemi

İmipenem ya da seftazidime, EDTA ya da MPA eklenerek E-test şeritleri geliştirilmiştir. MHA besiyerine test edilecek bakteri ekimi yapılır. Plaklar kuruduktan sonra E-test şeritleri yerleştirilir ve 35°C’de, 16-18 saat inkübasyondan sonra imipenem/imipenem-EDTA MİK oranlarının 8 kat azalması ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilir. Bu yöntem % 94 duyarlı ve % 95 özgün bulunmuştur⁶⁷.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Ç.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez laboratuvarından 1.03.2014 ile 5.09.2014 tarihleri arasında çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen klinik materyalden izole edilen ve VITEK-II cihazı ile tanımlanan 290 *A. baumannii*, 75 *P. aeruginosa*, 40 *K. pneumoniae*, 20 *E. coli*, 10 *P. mirabilis*, 13 *E. cloacae* ve 2 *Chryseobacterium indologenes* olmak üzere toplam 450 izolat hastane enfeksiyonları epidemiyolojisine ışık tutmak amacı ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatlar konvensiyonel kültür yöntemler, biyokimyasal testler ve BD-Crystal®Enteric/Non-fermanter İdentifikasyon kiti kullanılarak doğrulandıktan sonra karbapenem direncini tespit etmek amacıyla fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri ve dirençten sorumlu bilinen gen bölgelerini hedef alan primerler kullanılarak PCR ve Dizi Analizi gibi genotipik yöntemler kullanılmıştır. İzolatlar arasındaki muhtemel klonal ilişki ise PFGE yöntemiyle değerlendirilmiştir.

3.1. Test suşlarının üretilmesi, identifikasyonu:

Çalışmaya dahil edilen 130 izolatın üretilmesi ve doğrulanması için % 5 Koyun Kanlı Agar, Endo Agar, Macconkey, EMB besiyerleri, katalaz, oksidaz testi, biyokimyasal testler ve BD-Crystal®Enteric/Non-fermanter İdentifikasyon kiti kullanılmıştır⁶⁸.

3.2. Modifiye hodge testi ile karbapenem direncinin doğrulanması

Test IMP'ye duyarlı bir bakteri kökeninin, karbapenemaz üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu IMP varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testte IMP'ye duyarlı bakteri kökeni olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı. *E.coli* kökeninin kanlı agardaki taze kültürden MHB'ye 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu yapıldı. Ardından bakteri süspansiyonunun MHB' de 1:10 sulandırımı yapılarak, steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben besiyerinin merkezine IMP diskierleştirildi. Test edilecek kökenin kanlı agardaki taze kültürden öze ilebakteri klonileri toplandı ve IMP diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri doğru bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif biri negatif kontrol olmak üzere toplam iki izolat çalışılmış oldu. Inokülasyonu

takiben plaklar 35 °C – 37 °C 'de 18 saat inkübe edildi. Standart E.coli kökenine bağlı oluşan inhibisyon zonunun test suşunun üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede E.coli üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.

3.2.1. Mueller-Hinton Broth

Meat infusion 2,0 g/L

Casein hydrolysate 17,5 g/L

Starch 1,5 g/L

Hazır karışımını içeren MHB (HIMEDIA) damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edildi ve 45-50 °C'a soğutulup tüplere 2'şer mL döküldü.

3.2.2. Mueller-Hinton Agar

Meat infusion 2,0 g/L

Casein hydrolysate 17,5 g/L

Starch 1,5 g/L

Agar-agar 13,0 g/L.

Hazır karışımını içeren MHA (HIMEDIA®-M1084-500G) damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 45-50 °C'a soğutulup Petri kutularına 12,5'er mL döküldü.

3.3. CLSI kriterlerine göre Disk Difüzyon metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi

İzolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırıldığı Kirby-Bauer Disk Difüzyon testi CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) kriterleri Ocak 2014' te yayınlanan “Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23)” rehberinde yer alan Zone diameter and Minimal inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standarts for Enterobacteriaceae 'daki önerilere göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. CLSI kriterleri

Antibiyotikler	Zon Çapları (mm)		
	S (Duyarlı)	I (Orta dirençli)	R (Dirençli)
Penisilinler			
Ampisilin	≥ 17	14-16	≤ 13
B Laktam+ β laktamaz kombinasyonları			
Ampisilin+ Sulbaktam	≥ 15	12-14	≤ 11
Amoksisilin+ Klavulanat	≥ 18	14-17	≤ 13
Piperasilin+Tazobaktam	≥ 21	18-20	≤ 17
Sefalosporinler			
Sefotaksim	≥ 20	23-25	≤ 22
Sefoksitin	≥ 18	15-17	≤ 14
Sefepim	≥ 18	15-17	≤ 14
Monobaktam			
Azteronam	≥ 21	18-20	≤ 17
Karbapenemler			
Ertapenem	≥ 22	19-21	≤ 18
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19
Aminoglikozidler			
Gentamisin	≥ 15	13-14	≤ 12
Tetrasiklinler			
Tetrasiklin	≥ 15	12-14	≤ 11
Florokinolonlar			
Siprofloksasin	≥ 21	18-20	≤ 15
Folat yolu antagonistleri			
Trimetoprim+Sulfometaksazol	≥ 20	11-15	≤ 10
Polimiksinler			
Kolistin	≥ 2	4	≤ 8

3.3.1. Kirby bauer disk difüzyon testi

Çalışmaya alınan kökenlerin “Clinical Laboratory Standards Institute” kriterlerine göre, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çeşitli antibiyotikler için sınır değerleri ölçüldü. 18-20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri kullanıldı. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden MHB’de 0.5 McFarland bulanıklığında (108CFU/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben

antibiyotik diskleri birbirinden en az 22 mm uzaklık olacak şekilde besiyeri üzerine yerleştirildi. Bir gece 35°C–37°C 'lık etüvde 18-20 saat inkübe edildi. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek değerlendirildi.

3.3.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları (Tablo-3)' te verilmiştir.

Tablo 3. Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Kısaltma	Antibiyotik içeriği
Penisilinler		
Ampisilin	AM	10µg
β Laktam+β ve laktamaz kombinasyonları		
Ampisilin+ Sulbaktam	SAM	10/10µg
Amoksisilin+ Klavulanat	AMC	20/10µg
Piperasilin+Tazobaktam	TPZ	100/10µg
Sefalosporinler		
Sefotaksim	CTX	30µg
Sefoksitin	FOX	30µg
Sefepim	FEP	30µg
Monobaktam		
Azteronam	ATM	30µg
Karbapenemler		
Ertapenem	ETP	10µg
Imipenem	IPM	10µg
Meropenem	MEM	10µg
Aminoglikozidler		
Gentamisin	CN	10µg
Tetrasiklinler		
Tetrasiklin	TE	30µg
Florokinolonlar		
Siprofloksasin	CIP	5µg
Folat yolu antagonistleri		
Trimetoprim+Sulfometaksazol	SXT	1.25/23.75µg
Polimiksinler		
Kolistin	CL	10µg

3.4. Moleküler çalışmalar için DNA eldesi ve PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu

3.4.1. Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve enzimler

3.4.1.1. TE Buffer

Tris HCl (SIGMA T-3253): 0,1576 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 0,0372 gr

Distile Su:100 ml

(pH 8.0)

3.4.1.2. dNTP Karışımı

(25µmol her biri) (Fermentas R0181)

(2,5 mM herbiri, toplam 10mM)

dATP (100 mM): 25 µl

dCTP (100 mM): 25 µl

dGTP (100 mM): 25 µl

dTTP (100 mM): 25 µl

Distile su: 900 µl.

-20°C' de saklandı.

3.4.1.3. Marker

Gene Ruler 200bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Fermentas SM0323)

3.4.1.4. Taq DNA polimeraz enzimi

(Fermentas EP0402) 5U/ µl

10X PCR tampon çözelti

25 mM MgCl₂

3.4.1.5. 10xTBE Solüsyonu

Tris-base (SIGMA T-1503): 108gr

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500): 55gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 7,44gr

(pH 8.4) ve Ultra pure su ile 1000ml 'ye tamamlandı.

3.4.1.6. Etidyum bromid

Etidyum bromid (Sigma E8751) (1000X, 5mg/ml): 0,5g

Distile su: 100ml

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı. +4°C' de saklandı.

3.4.2. DNA Eldesi

DNA ekstraksiyonu amacıyla cam boncuklarla mekanik lizis prensibine dayalı çalışan MICKLE (The Mickle Lab.Engineering Co. Ltda, Gomshall, Surrey, UK) cihazı kullanılmıştır.

1. Saf olarak elde edilen örnekler distile su ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspanse edildi.
2. Hazırlanan bakteri süspanسیونundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 8000 xg de 3 dakika oda ısısında santrifüj (HERAEUS Biofuge Primo R) edildi.
3. Üst sıvı atılıp ve pelletin üzerine 500 µl TE buffer (10mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5) eklendi.
4. Daha sonra 100°C'de, 10 dakika kuru ısı bloğunda (BİOSAN Termoblock TDB-120) tutuldu.
5. 500 µl bakteri süspanسیونuna 150 µl boncuk(SIGMA) konuldu ve Mickle cihazında (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) maksimum hızda (10), 7 dakika mekanik lizise uğratıldı.
6. 12.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.
7. 200 µl süpernatant alınıp ve yeni bir ependorfa aktarıldı.
8. Ekstraksiyonu tamamlanan örneklerle işlemin başarılı olup olmadığını test etmek için Spektrofotometre (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) ile 260nm'de DNA ölçümü yapıldı. Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonu 0.1-1.2 µg/µl arası olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

3.4.3. PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu

Ekstakte edilen DNA örnekleri ilk önce karbapenemaz genlerinin varlığı açısından değerlendirilmek üzere Tablo 4' teki primerlere kullanılarak multiplex-PCR ile amplifikasyona tabi tutuldu. Daha sonra dizi analizi ile tiplendirilmesi gerektiği düşünülen örnekler daha spesifik olan Tablo 5' teki primerlerle tekrar tüm gen bölgesi amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon şartları GenBank' tan alınan tüm karbapenemaz gruplarını temsil eden referans diziler BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) düzenlendi.

Amplifikasyon işlemleri; 5 µl 10x PCR buffer, 3.5 Mm MgCl₂, herbir dNTP' den 200 µM, 0.5 µl primer (100 pmol/ µl stok solüsyondan), 3 U Taq polymerase ve 1 µl kalıp plazmid DNA (100 ng/µl) ve steril distile su ile toplam 50 µl' ye tamamlanan PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

94 °C' de 3 dak. İlk denaturasyon
94 °C' de 30 sn. Denaturasyon
55-60 °C' de 40 sn. Bağlanma (annealing) 40 siklus
72 °C' de 40 sn. Uzama (extension)
72 °C' de 10 dak. Son uzama

Sonuçların değerlendirilmesi için, 1X TBE içinde % 1.5 agaroz jel hazırlandı ve mikrodalda fırında eritildi. 50 ml eriyik içine 5 mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5µl eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. PCR ürünleri jel yükleme tamponu ile 1.5 oranında (3 µl jel yükleme tampon çözeltisi + 15 µl çoğaltılmış ürün) karıştırılarak her bir kuyuyu 18 µl, ardışık iki kuyuyada GeneRuler 50 ve 100 bp DNA Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 120 V uygulanarak 60 dakika yürütüldü.

Sonuçlar UV ışığı altında görüntüldü. Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.

Tablo 4. Multiplex-PCR’da kullanılan primerler^{69,70}.

PCR set ismi ve hedeflenen β -laktamaz genleri	Primer İsmi	(5’-3’) Dizilim	Amplikon
<u>Multiplex I</u> TEM, SHV ve OXA-1-like	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800 bp
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713 bp
	MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564 bp
	MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG	
<u>Multiplex II</u> GES ve OXA-48-like	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399 bp
	MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
	MultiOXA-48_for	GCTTGATCGCCCTCGATT	281 bp
	MultiOXA-48_rev	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	
<u>Multiplex III</u> IMP, VIM ve KPC	MultiIMP_for	TTGACACTCCATTTACDG	139 bp
	MultiIMP_rev	GATYGAGAATTAAGCCACYCT	
	MultiVIM_forc	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390 bp
	MultiVIM_revc	CGAATGCGCAGCACCAG	
	MultiKPC_for	CATTCAAGGGCTTCTTGCTGC	538 bp
	MultiKPC_rev	ACGACGGCATAGTCATTTGC	
<u>MGB</u> GIM-1 SIM-1 NDM-1 SPM-1	GIM-GBM-F	CGTTGCCAGCTTTAGCTCAGG	279 bp
	GIM-GBM-R	GCAACTTGATACCAGCAGTGCG	
	SIM-GBM-F	TTGCGGAAGAAGCCCAGCCAG	613 bp
	SIM-GBM-R	GCGTCTCCGATTTCACTGTGGC	
	NDM-GBM-F	CCCGGCCACACCAGTGACA	129 bp
	NDM-GBM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	
	SPM-GBM-F	GGGTGGCTAAGACTATGAAGCC	447 bp
	SPM-GBM-R	GCCGCCGAGCTGAATCGG	
<u>MGD1</u> OXA-23, -27, -49, -73, -133, -146 OXA-24 (= -33, -40), -25, -26, -72, -139, -160 [OXA-143, -182] OXA-48, -54 ve [OXA-181]	O23-GDM-F	CCTGATCGGATTGGAGAACCAG	516 bp
	O23-GDM-R	GATGCCGGCATTCTGACCG	
	O24-GDM-F	GGTCGATAATTTTGGTTAGTTGGCCC	237 bp
	O24-GDM-R	CCATTAGCTTGCTCCACCCAACCAG	
	O48-GDM-F	CCAAGCATTTTACCCGCATC	389 bp
	O48-GDM-R	GYTTGACCATACGCTGRCTGCG	
<u>MGD2</u> OXA-51, OXA58	O51-GD2M-F	GACCGAGTATGTACCTGCTTCGACC	497 bp
	O51-GD2M-R	GAGGCTGAACAACCCATCCAGTTAACC	
	O58-GD3M-F	GTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGC	630 bp
	O58-GD3M-R	GGTCTACAGCCATTCCCCAGCC	
Y=T , C; R=A ,G; S=G , C; D=A,G, T.			

Tablo 5. PCR’la karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan primerler⁷¹.

Enzim ailesi	Primer	Primer Dizisi (5”-3”)	Amplikon boyutu
A sınıfı karbapen karbapenemazlar			
KPC	KPCf	ATGTCACGTATCGCCGTCT	893
	KPCr	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
GES	GESf	GTTTTCGAATGTGCTCAACG	371
	GESr	TGCCATAGCAATAGGCGTAG	
B sınıfı Karbapenemazlar			
IMP-1	f	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	740
	r	TTAGTTGCTTGGTTTGTATG	
IMP-2	f	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	737
	r	TAGTTACTTGGCTGTGATGG	
VIM-1	f	TTATGGAGCAGCAACCGATGT	920
	r	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA	
VIM-2	f	AAAGTTATGCCGCACTCACC	865
	r	TGCAACTTCATGTTATGCCG	
SPM-1	SPM-1f	CCTACAATCTAACGGCGACC	650
	SPM-1r	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	
GIM-1	GIM-1f	AGAACCTTGACCGAACGCAG	748
	GIM-1r	ACTCATGACTCCTCACGAGG	
SIM-1	SIM-1f	TACAAGGGATTTCGGCATCG	570
	SIM-1r	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
NDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	

3.5. Çoğaltılan genlerin dizi analizi

3.5.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılmasında, dizi analizi tepkimelerini etkileyen, ortamda kullanılmayan nükleotit ve primerlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. PCR ürünleri “SentroPure® PCR ürünü saflaştırma & jelden DNA ekstraksiyon kiti (SENTROMER®)” saflaştırma sistemi ile protokol ’de önerildiği şekilde saflaştırıldı.

1. Steril 1,5 ml tüp içerisine, her 1µl PCR ürünü için 4µl SG solüsyonu (DNA immobilizasyonunu sağlar, pH 6,6) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

2. Karışım SentroSpin kolonuna (Aritma filtresi içeren ve toplama tüpünün içine yerleşen kolon) aktarıldı, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
3. Sentrospin kolonuna 500µl Solüsyon SW (DNA’nın arıtılmasını sağlar, pH 7,5) eklendi, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü. İşlem tekrarlandı.
4. Arıtma işleminden sonra SentroSpin kolonu 13000 rpm’de 1 dakika boş olarak santrifüj edilerek kalan etanol uzaklaştırıldı.
5. Sentrospin kolonu 1,5 ml’lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek başlangıç PCR ürünü miktarı kadar Solüsyon SE (DNA’nın toplanmasını sağlar, pH 8,5) eklendi. SE solüsyonu kolonun tam ortasına eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.
6. Saflaştırılmış DNA örnekleri spektrofotometrede DNA kantitasyonu yapıldıktan sonra dizi analizi çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.5.2. Dizi analizi çalışmaları

Dizi analizi çalışmaları, “ABI Prism 310 DNA squencer (Applied Biosystems)” otomatize sistemi kullanılarak, “F.Sanger’ in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi” prensiplerine göre dizi analizi yapıldı.

3.5.3. Dizi Analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Dizi analizi ile elde edilen veriler, “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmak için “nucleotide-nucleotide blast” (blastn) programı seçildi.

3.6. Klonal ilişkinin tespiti

İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilen Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi kullanılacaktır. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, hastanelerde ve toplum içinde enfeksiyon etkenlerinin yayılma dinamiğini anlama ve kontrol etmede PFGE, moleküler

epidemiyolojik yöntemler arasında tiplendirebilirliği, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü ile öne çıkan, kullanılabilen uygun bir yöntemdir.

3.6.1. PFGE Protokol, KEP A (Klebsiella, E.coli, P.aeruginosa, Acinetobacter)

A-İzolatların hazırlanması

1. Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden tek koloni ekimi yapılır. (Acinetobacter, Klebsiella, E.coli Kanlı by, P.aeruginosa Müller-Hinton by)
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilir.
3. Buradaki tek koloniden tekrar uygun besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılır.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 2 ml hücre süspansiyon tamponu süspanse edilerek bakteri yoğunluğu yaklaşık McFarland 5-6 bulanıklığı olacak şekilde ayarlanır.
5. 1ml bakteri süspansiyonu 13000g x 3dk santrifüj edilerek süpernatant atılır ve pellet üzerine 1ml HST eklenir ve pipetaj yapılır.

B- İzolatların agaroz a gömölmesi

1. HST içerisinde %2’lik low melting agaroz hazırlanır. 0.2 g agaroz, 10 ml’lik balona konur. Üzerine 9 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın erimesi sağlanır. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutulur. Agaroz iyice çözölünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır. Agaroz iyice çözöldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konulur. %10 sodyum dodesil sülfat solüsyonundan 1 ml eklenir. Ependorf tüplere, 200 µl dağıtılır ve 45–50°C’deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletilir.
2. Her suş için bir agoroz kalıbı işaretlenip kalıp buz kabına oturtulur.

3. Bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısı ısı agaroz bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır.
4. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtılır.
5. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 20 dakika bekletilir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

C- Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, her örnek için 0,5 ml Lizis I solusyonu konulur ve 1,5mg /ml proteinaz K ve 2,5mg/ml lizozim eklenir.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis I solüsyonuna yerleştirilir ve 37°C'de, 1 saat çalkalamalı su banyosunda hafif yatık pozisyonda yerleştirilerek bekletilir.
3. Daha sonra içerisine 400ug/ml Protinaz K eklenen Lizis II tamponuna alınarak 55 °C de 2 saat inkübe edilir.

D-Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilir ve dikkatlice lizis solusyonu aspire edilir.
2. Daha sonra agaroz kalıpları önce 4 ml ultrapür saf su ile 3 defa , 50°Cde, 15 dakika ve 4 ml TE tamponuyla 3defa, 50°C'de 15 dakika süre ile yıkanır
3. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

E- Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi:

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 µl 1x enzim tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10-15 dakika bekletir. (Diğer parçalar

sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4 derece saklanır).
Sonra sıvı aspire edilir.

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>
Steril enjeksiyon su	90ul	90ul	90ul	90ul
Enzim tamponu	10ul	10ul	10ul	10ul
Σ	100ul	100ul	100ul	100ul

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>
Steril enjeksiyon su		87ul	87ul	87ul
Enzim tamponu	10ul	10ul	10ul	10ul
Enzim	SpeI:	(ApaI:30U) 3ul	(XbaI: 30U) 3ul	(XbaI: 30U) 3ul
Σ	100ul	100ul	100ul	100ul

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 4 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir.
5. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

F- Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 100 ml 0.5x TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde %1.1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlanır.
 - a) 1,1 g “pulsed-field certified agarose” balona konur.
 - b) Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - c) Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutulur.
 - d) Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konulur.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulur.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar veya moleküler standart marker yüklenir.
4. Kurutma kâğıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir.
5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkati bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür.
6. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1'lik agarozla doldurulabilir.
7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir. Elektroforeze tabi tutulur.

Elektroforez Şartları	<i>E.coli, Acinetobacter, Klebsiella</i>	<i>P.aeruginosa</i>	
		Blok I	Blok II
İnitial time	5sn	5	30
Final time	30sn	45	45
Voltaj	6v/cm	6	6
Süre	20 saat	20	6
Akım	130-140 mA	150-160 mA	

G- Sonucun analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı.
2. Sonra UV ışığı altında görüntülendi.
3. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

4. GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

3.6.1.1. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

Pulsed field jel elektroforez yönteminde kullanılan solüsyonlar laboratuvarımızda aşağıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

Hücre süspansiyon Tamponu (1x/100ml) pH:8,0

100mM Tris-HCl 1,576gr

100mM EDTA 3,722gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

Lizis I solüsyonu (1x/100ml) pH:8,0

50mM Tris-HCl 0,788gr

50mM EDTA 1,861gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

****PFGE kalıpları bu solüsyonda lizisten önce 2,5mg/ml lizozim ve 1,5mg/ml Proteinaz K eklenmelidir.

Lizis II solüsyonu (1x/100ml) pH:8,5

500mM EDTA 18,61gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. Ancak EDTA’nın çözülebilmesi için NaOH pelleti eklenir. pH 8,22ye ayarlandığında 1gr N-lauryl sarkozin eklenir.

****Bu solüsyona 400ug/ml proteinaz K eklenmelidir.

TE solüsyonu (1x/1000ml) pH:7,6

10mM Tris-HCl 1,576gr

0,1mM EDTA 0,0372gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

TBE solüsyonu (10x/1L)

Tris base 107,8gr

Borik Asit 55gr

EDTA 7,44gr

1L ultra pure su ile tamamlanır.

%10 SDS Solüsyonu

4. BULGULAR

Çalışmada Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarından alınan Karbapenem dirençli 450 Gr(-) bakteri izolatın antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak, PCR ve Dizi Analizi yöntemleriyle genotipik olarak karbapenemaz enzimleri araştırılmıştır. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişki ise PFGE yöntemiyle değerlendirilmiştir.

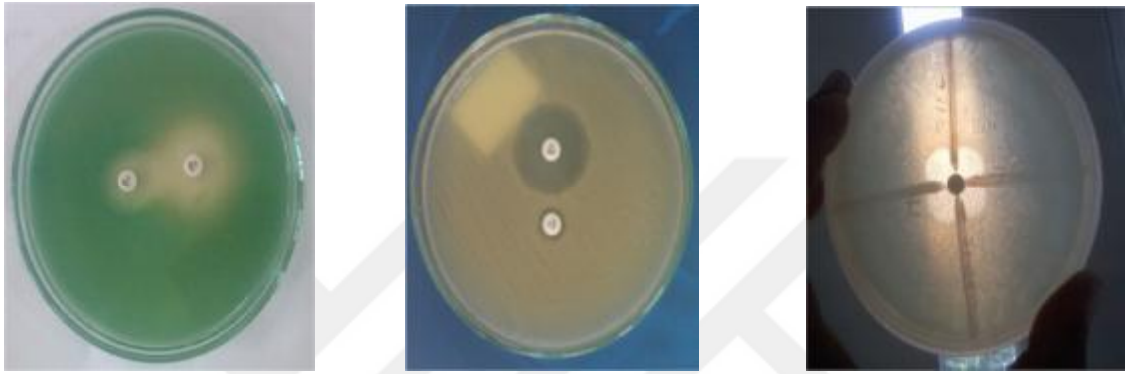
İzolatların tanımlanması amacıyla Ç.Ü. Merkez Laboratuvarından laboratuvarımıza transorte edilen Karbapenem dirençli Gram-negatif basil olarak tanımlanan örnekler, tanının doğrulanması amacıyla çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlere tabii tutulmuştur. Bu amaçla örnekler gram boyama, besiyerlerinde kültür testleri, katalaz testi, oksidaz testi, IMVIC testleri ve BD-CRYSTAL® Enteric/ Non-fermenter İdentifikasyon Testi ile değerlendirilmiştir.

Yapılan tür tanımlama işlemleri sonrası klinik örneklerde üreyen mikroorganizma türleri ve sayıları; 290 *A.baumannii*, 75 *P.aeruginosa*, 40 *K.pneumoniae*, 20 *E.coli*, 10 *P.mirabilis*, 13 *E.cloacae* ve 2 *Chryseobacterium indologenes* şeklinde oluşmuştur.

Tür tanımlama işlemlerinden sonra metallo-β-laktamazların fenotipik ayrımı için kombine disk ve Modifiye Hodge testi yapılmıştır. Metallo-β-laktamaz dirençli Gram-negatif basil ön tanısı ile gelen 450 Gr (-) izolatın, yapılan kombine disk ve Modifiye Hodge testi sonucu 130 tanesi metallo-β-laktamaz pozitif bulunmuştur. 450 izolattan 130' u metallo-β-laktamaz dirençli olarak tanımlayan kombine disk ve Modifiye Hodge testinin VITEKII ile karşılaştırıldığında sensitivitesi % 28.8 (130/450) olarak değerlendirilmiştir. Genotipik çalışmalara Modifiye Hodge Testi karbapenem direnci açısından altın standart kabul edildiğinden Modifiye Hodge Testinde pozitif olduğu belirlenen 130 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Modifiye Hodge testi ve kombine disk testi ile fenotipik olarak metallo-β-laktamaz sentezlediği doğrulanamayan 320 izolatın çıkarılması sonucu genotipik çalışmalara dahil edilen yeni türlerin dağılımı 88 *A. baumannii*, 26 *P. aeruginosa*, 9 *K.pneumoniae*, 3 *E. coli*, 1 *P. mirabilis*, 1 *E. cloacae* ve 2 *Chryseobacterium indologenes* şeklinde oluşmuştur (Tablo-6, Şekil-4).

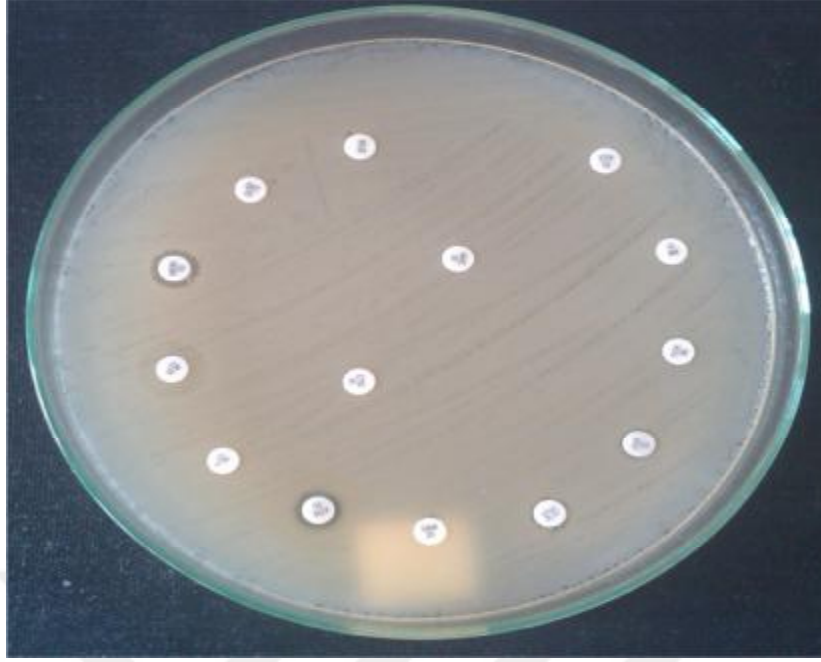
Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen 130 izolatın tür dağılımı

İzolatlar	Sayı	Yüzde dağılımı %
<i>A. baumannii</i>	88	67.69
<i>P. aeruginosa</i>	26	20
<i>K. pneumoniae</i>	9	6.92
<i>E. coli</i>	3	2.30
<i>C. indologenes</i>	2	1.53
<i>P. mirabilis</i>	1	0.76
<i>E. cloacae</i>	1	0.76
Toplam	130	



Şekil 4. Kombine disk ve Modifiye Hodge Testi pozitif izolatın oluşturduğu görünüm.

Çalışmaya dahil edilen 130 izolatın çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi için CLSI önerilerine göre Kirby-Bauer Disk Difüzyon testi yapılmıştır. Test edilecek antibiyotikler seçilirken klinikte kullanıma rehber niteliğinde olabilecek şekilde her antibiyotik grubundan en az bir temsilci olmasına dikkat edildi. Penisilinlerden Ampisilin, B-laktam + betalaktamaz kombinasyonlarından Ampisilin + Sulbaktam, Amoksisilin + Klavulanat, Piperasilin + Tazobaktam, Sefalosporinlerden Sefazolin, Sefotaksim, Seftazidim, Seftriakson, Sefuroksim, Sefoksitin, Sefepim, Sefoperozan-Sulbaktam Monobaktam olarak Aztreonam, Karbapenemlerden Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Nitrofrantoin, Aminoglikozidlerden Gentamisin, Netilmisin Tetrasiklinlerden Tetrasiklin, Florokinolonlardan Siprofloksasin, Levofloksasin, Folat yolu antagonistlerinden Trimetoprim + Sulfometaksazol, Polimiksinlerden Kolistin ve Tigesiklin antibiyotiklerine karşı izolatların duyarlılık hesapları CLSI kriterleri baz alınarak yapıldı (CLSI kriterleri Tablo 2 de gösterilmiştir). Kirby-Bauer Disk Difüzyon antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları (Şekil 5 ve Tablo 7,8,9,10,11,12,13)'de verilmiştir.



Şekil 5. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi

Tablo 7. *A. Baumannii* (88 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (R)		Orta duyarlı (I)		Hassas (S)	
	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %
AMİKASİN	51	57.95	3	3.4	34	38.63
AMPİSİLİN SULBAKTAM	85	96.59	3	3.40	-	-
SEFEPİM	13	97.72	1	2.27	-	-
SEFTAZİDİM	87	98.86	1	1.13	-	-
SİPROFLOKSASİN	85	96.59	1	1.13	2	2.27
KOLİSTİN	1	1.13	-	-	87	98.86
GENTAMİSİN	79	89.77	-	-	9	10.22
İMİPENEM	87	98.86	1	1.13	-	-
LEVOFLOKSASİN	77	87.5	11	12.5	-	-
MEROPENEM	88	100	-	-	-	-
PIPERASILİN	88	100	-	-	-	-
TETRASİKLİN	67	76.13	1	1.13	20	22.72
TİGESİKLİN	12	13.63	18	20.45	58	65.90
TRİMETOPRİM SÜLFAMETOKSAZOL	82	93.18	-	-	6	6.81
PIPERASILİN/TAZOBAKTAM	88	100	-	-	-	-

Tablo 8. *P. aeruginosa* (26 izolat) Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (R)		Orta duyarlı (I)		Hassas (S)	
	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %
AMİKASİN	19	73.07	-	-	7	26.92
AMPİSİLİN SULBAKTAM	26	100	-	-	-	-
SEFEPİM	16	61.53	7	26.92	3	38.46
SEFOPERAZON-SULBAKTAM	18	69.23	7	26.92	1	3.84
SEFTAZİDİM	16	61.53	6	23.07	4	15.38
SİPROFLOKSASİN	18	69.23	-	-	8	30.76
KOLİSTİN	-		-	-	26	100
GENTAMİSİN	17	65.38	-	-	9	34.61
NETİLMİSİN	16	61.53	6	23.07	4	15.38
IMIPENEM	26	100	-		-	-
LEVOFLOKSASİN	18	69.23	-	-	8	30.76
MEROPENEM	25	96.15	1	3.84	-	-
PIPERASILIN	2	76.92	6	23.07	-	-
TETRASIKLIN	26	100	-		-	-
TIGESIKLIN	25	96.15	1	3.84	-	-
TRİMETOPRİM SÜLFAMETOKSAZOL	26	100	-	-	-	-
PIPERASILIN/TAZOBAKTAM	26	100	-	-	-	-

Tablo 9. *K. pneumoniae* (9 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (R)		Orta duyarlı (I)		Hassas (S)	
	Sayı	Yüzde%	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %
AMİKASİN	4	44.44	5	55.55	-	-
AMPİSİLİN	9	100	-	-	-	-
AMOKSİSİLİN- KLAVULANİKASİT	9	100	-	-	-	-
SEFEPİM	8	88.88	1	11.11	-	-
SEFOKSİTİN	9	100	-	-	-	-
SİPROFLOKSASİN	9	100	-	-	-	-
KOLİSTİN	3	33.33	-	-	6	66.66
ERTAPENEM	9	100	-	-	-	-
GENTAMİSİN	7	77.77	-	-	2	22.22
İMİPENEM	8	88.88	1	11.11	-	-
MEROPENEM	9	100	-	-	-	-
TRİMETOPRİM -SÜLFAMETOKSAZOL	8	88.88	-	-	1	11.11
PIPERASİLİN/TAZOBAKTAM	9	100	-	-	-	-

Tablo 10. *E. coli* (3 izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

ANTİBİYOTİK	Dirençli (R)		Hassas (S)	
	Sayı	Yüzde%	Sayı	Yüzde%
AMİKASİN	2	66.67	1	33.33
AMOKSİSİLİN- KLAVULANİKASİT	3	100	-	-
AMPİSİLİN	3	100	-	-
SEFOKSİTİN	3	100	-	-
SEFTRİAKSON	3	100	-	-
SEFUROKSİM	3	100	-	-
SİPROFLOKSASİN	3	100	-	-
ERTAPENEM	3	100	-	-
FOSFOMİSİN	-	-	3	100
GENTAMİSİN	2	66.67	1	33.33
İMİPENEM	3	100	-	-
MEROPENEM	3	100	-	-
NITROFURANTOİN	3	100	-	-
PIPERASİLİN -TAZOBAKTAM	3	100	-	-
TRİMETOPRİM -SÜLFAMETOKSAZOL	3	100	-	-
KOLİSTİN	-	-	3	100

Tablo 11. *Chryseobacterium indologenes* (2 izolat) Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

ANTİBİYOTİK	Dirençli (R)		Hassas (S)	
	Sayı	Yüzde%		Yüzde%
AMİKASİN	2	100	-	-
TİKARSİLİN KLAVULANİK ASİT	2	100	-	-
SEFTAZİDİM	2	100	-	-
SEFOPERAZON SULBAKTAM	2	100	-	-
SİPROFLOKSASİN	-	-	2	100
KOLİSTİN	2	100	-	-
SEFAZOLİN	2	100	-	-
ERTAPENEM	2	100	-	-
SEFEPİM	2	100	-	-
SEFOKSİTİN	2	100	-	-
GENTAMİSİN	2	100	-	-
İMİPENEM	2	100	-	-
LEVOFLOKSASİN	-	-	2	100
MEROPENEM	2	100	-	-
PİPERASİLİN TAZOBAKTAM	2	100	-	-
TRİMETOPRİM SÜLFAMETOKSAZOL	-	-	2	100
AZTREONAM	2	100	-	-

Tablo 12. *Proteus mirabilis* (1izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

ANTİBİYOTİK	Dirençli (R)- Orta duyarlı (I)- Hassas (S)
AMİKASİN	S
AMPİSİLİN SULBAKTAM	R
SEFEPİM	I
SEFOPERAZON/ SULBAKTAM	R
SEFTAZİDİM	I
SİPROFLOKSASİN	S
KOLİSTİN	R
GENTAMİSİN	S
İMİPENEM	R
LEVOFLOKSASİN	S
MEROPENEM	R
NETİLMİSİN	S
PİPERASİLİN	R
PİPERASİLİN /TAZOBAKTAM	R
TETRASİKLİN	R
TİGESİKLİN	R
TRİMETOPRİM SÜLFAMETOKSAZOL	R

Tablo 13. *Enterobacter cloacae* (izolat), Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları

ANTİBİYOTİK	Dirençli (R)- Orta duyarlı (I)- Hassas (S)
AMİKASİN	R
AMPİSİLİN SULBAKTAM	R
SEFEPİM	R
SEFOPERAZON/ SULBAKTAM	R
SEFTAZİDİM	R
SİPROFLOKSASİN	S
KOLİSTİN	S
GENTAMİSİN	R
İMİPENEM	R
LEVOFLOKSASİN	S
MEROPENEM	R
NETİLMİSİN	R
PİPERASİLİN	R
PİPERASİLİN /TAZOBAKTAM	R
TETRASİKLİN	R
TİGESİKLİN	S
TRİMETOPRİM SÜLFAMETOKSAZOL	R

Metallo- β -laktamazların ayrımı için yapılan fenotipik çalışmaların ardından karbapenemaz genlerinin karakterizasyonunu tespit etmek amacıyla genotipik çalışmalara geçilmiş ve bu amaçla sıklıkla görülen β -laktamaz genlerini hedefleyen in-house PCR ve Multiplex-PCR metodları ile amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tespit edilen metallo- β -laktamaz genleri daha spesifik primerlerle amplifiye edilerek dizi analizleri yapılmış ve sub-tip düzeyinde tanımlandırılmıştır. Türler içerisinde β -laktamaz gen profillerini tanımlayan PCR sonuçları ve dizi analizi yapılan genlerin profilleri (Tablo-14,15,16,17,18)' de verilmiştir.

Tablo 14. PCR sonucu *A. Baumannii* (88) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.

β -laktamaz genleri	Sayı	Yüzde %
OXA-51-Like	88	100
OXA-23-Like	54	61.36
OXA-24-Like	15	17.04
NDM	2	2.28
TEM	20	22.73
OXA-48-Like	3	3.40
GES	5	5.69
CTX-M	6	6.82
CTX-M 1	1	1.14
CTX-M 2	1	1.14
CTX-M 9	2	2.28

Tablo 15. PCR sonucu *P. aeruginosa* (26) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.

β -laktamaz genleri	Sayı	Yüzde %
OXA-23-Like	4	15.38
OXA-48-Like	4	15.38
GES	2	7.70
CTX-M	1	3.85
VIM-1	1	3.85

Tablo 16. PCR sonucu *K. pneumoniae* (9) izolatlarında amplifiye edilen β -laktamaz genleri.

β -laktamaz genleri	Sayı	Yüzde %
OXA-48-Like	4	44.44
OXA-24-Like	2	22.22
CTX-M	4	44.44
CTX-M 9	4	44.44

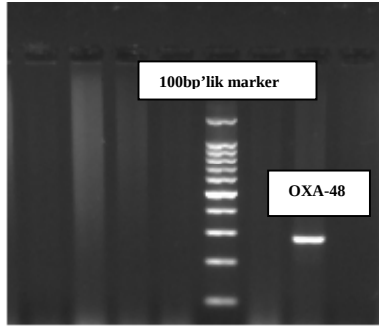
Ayrıca yapılan diğer PCR analizleri sonucunda 3 *E.coli* izolatlarının bir tanesinde NDM, 2 izolatta OXA-48-Like geni ve 1 *Enterobacter cloacae* izolatında NDM, OXA-48-like ve CTX-M1 genleri tespit edilmiştir.

Tablo 17. Multiplex-PCR sonucu kökenlerde amplifiye edilen β -laktamaz genlerinin dağılımı.

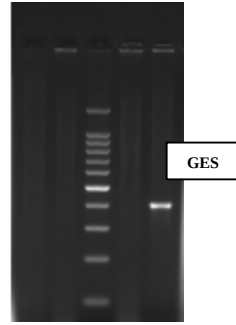
Kod	Tür	B-laktamazlar	Kod	Tür	B-laktamazlar
1	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like + OXA-24-like	66	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+OXA-23-like
2	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	67	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+NDM-1
3	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+OXA-24-like	68	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+ OXA-23-like
4	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-24-like	69	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+GES+ OXA-23-like
5	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	70	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like
6	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	71	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like
7	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+OXA-24-like	72	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+CTX-M9
8	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	73	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like
9	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	74	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like +TEM+ GES +OXA-23-like
10	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	75	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+CTX-M+ OXA-23-like
11	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+CTX-M2	76	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like + TEM + OXA-23-like+ OXA-48-like
12	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-24-like	77	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like
13	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	78	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like
14	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	79	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+OXA-23-like
15	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	80	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like +OXA-24-like
16	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	81	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+OXA-23-like+ OXA-24-like
17	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	82	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-24-like
18	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	83	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like

19	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	84	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ CTX-M9+ OXA-23-like+ OXA-24-like
20	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-48-like	85	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like
21	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	86	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like
22	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	87	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+GES+ OXA-23-like
23	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	88	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+CTX-M1
24	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	89	<i>P. aeruginosa</i>	-
25	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+GES	90	<i>P. aeruginosa</i>	-
26	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+OXA-23-like	91	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-23-like
27	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM	92	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48-like
28	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM+ OXA-23-like	93	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48-like
29	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	94	<i>P. aeruginosa</i>	-
30	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM+ OXA-23-like	95	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-1
31	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	96	<i>P. aeruginosa</i>	-
32	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	97	<i>P. aeruginosa</i>	GES
33	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	98	<i>P. aeruginosa</i>	-
34	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	99	<i>P. aeruginosa</i>	-
35	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM	100	<i>P. aeruginosa</i>	CTX-M
36	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM	101	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48-like
37	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	102	<i>P. aeruginosa</i>	-
38	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	103	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48-like
39	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	104	<i>P. aeruginosa</i>	-
40	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+ OXA-23-like	105	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-23-like
41	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+NDM-1+ OXA-23-like	106	<i>P. aeruginosa</i>	-
42	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	107	<i>P. aeruginosa</i>	-
43	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+ OXA-23-like	108	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-23-like
44	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+ OXA-23-like	109	<i>P. aeruginosa</i>	-
45	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	110	<i>P. aeruginosa</i>	-

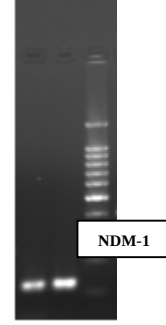
46	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	111	<i>P. aeruginosa</i>	GES
47	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+- OXA-23-like	112	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-23-like
48	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM	113	<i>P. aeruginosa</i>	-
49	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	114	<i>P. aeruginosa</i>	-
50	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	115	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48-like + CTX-M9
51	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like+ OXA-24-like	116	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48-like + CTX-M9
52	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	117	<i>K. pneumoniae</i>	-
53	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+OXA-23-like	118	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48-like
54	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like	119	<i>K. pneumoniae</i>	IMP
55	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	120	<i>K. pneumoniae</i>	-
56	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM	121	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-24-like +-CTX-M9
57	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM+ OXA-23-like	122	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-24-like + CTX-M-9
58	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+OXA-23-like	123	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48-like
59	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+OXA-23-like	124	<i>E.coli</i>	OXA-48-like
60	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+CTX-M+OXA-23-like	125	<i>E.coli</i>	NDM-1
61	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ OXA-23-like	126	<i>E.coli</i>	OXA-48-like
62	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+TEM+OXA-23-like	127	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-
63	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM+ OXA-23-like	128	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-
64	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+GES+OXA-23-like	129	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1+OXA-48-like + CTX-M-1
65	<i>A. baumannii</i>	OXA-51-like+ TEM+ OXA-23-like+ OXA-48-like	130	<i>Proteus mirabilis</i>	-



Şekil 6. *K. pneumoniae* izolatına ait 281 bp'lik OXA-48 geninin bant profilini gösteren jel görüntüsü.



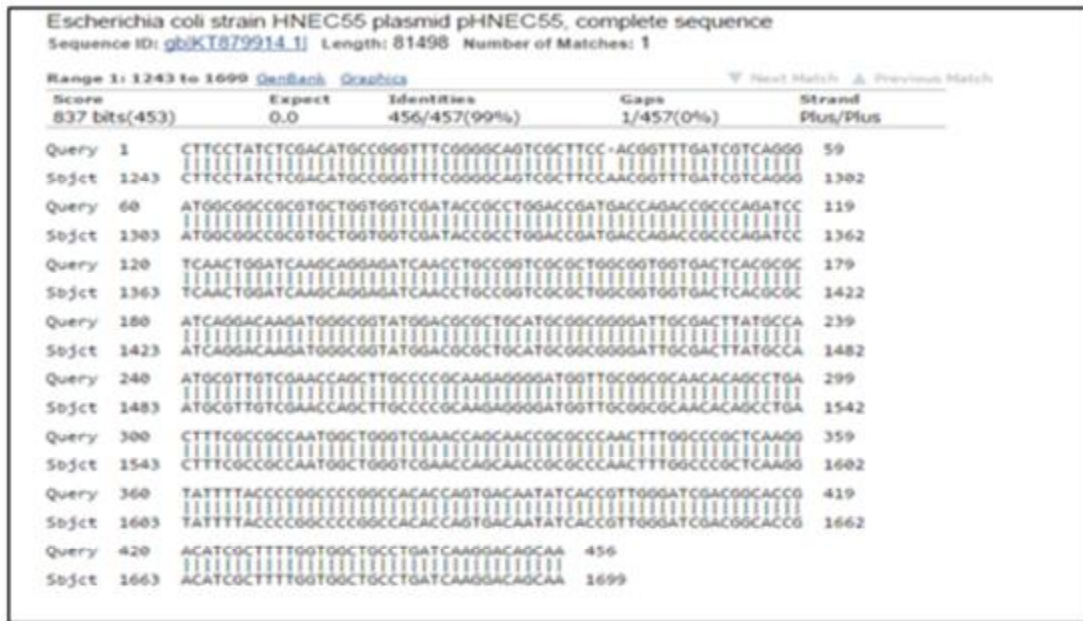
Şekil 7. *A. baumannii* izolatına ait 399 bp'lik GES geninin bant profilini gösteren jel görüntüsü.



Şekil 8. *E.coli* izolatına ait 129 bp'lik NDM-1 geninin bant profilini gösteren jel görüntüsü.

Tablo 18. Dizi analizi yapılan karbapenemaz genlerinin sub-tip sonuçları

	OXA-48	GES	VIM	NDM
<i>A. baumannii</i>	3* OXA-48	5*GES-11	-	2*NDM-1
<i>P. aeruginosa</i>	4* OXA-48	1*GES-11+1*GES-12	1*VIM-1	-
<i>K. pneumoniae</i>	4* OXA-48	-	-	-
<i>E.coli</i>	2* OXA-48	-	-	1*NDM-1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1* OXA-48			1*NDM-1



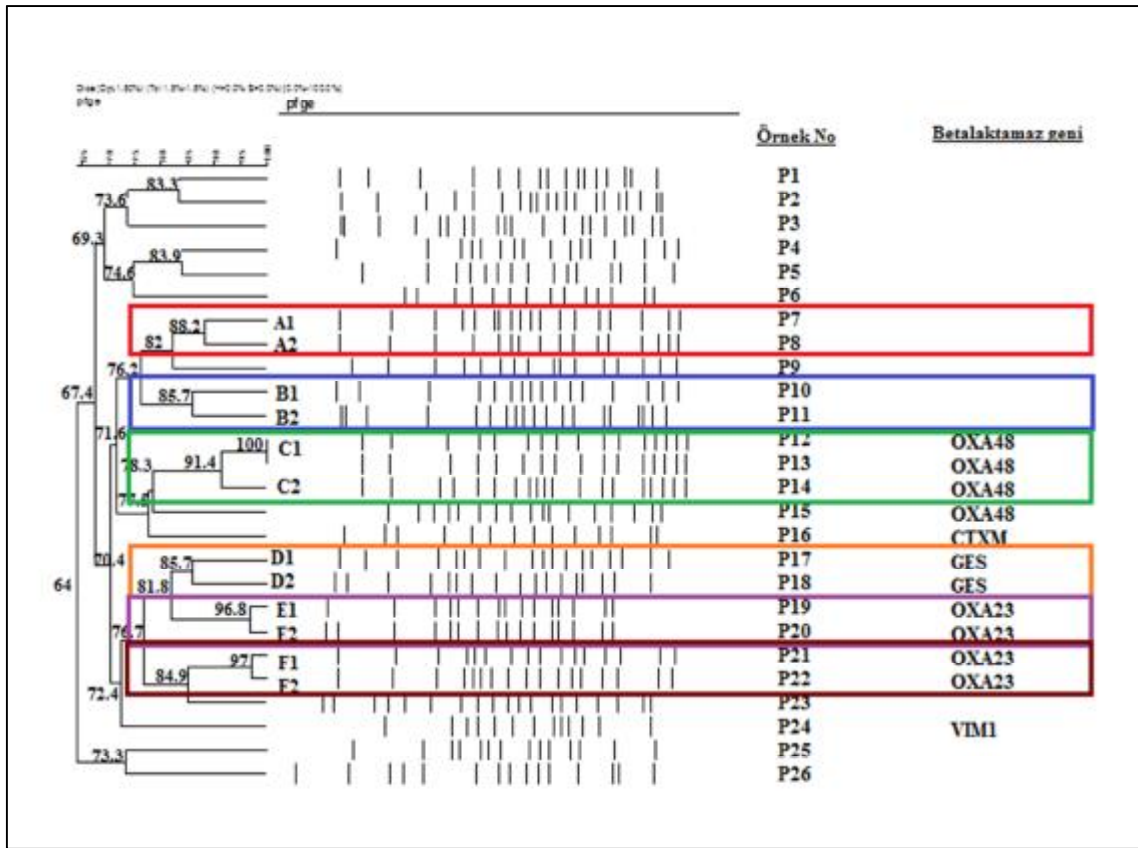
Şekil 9. Dizi analizi sonucu elde edilen *E.coli* izolatında NDM-1 tipi karbapenemaz geninin BLAST taraması

Çalışmamızda hastane ve toplum kökenli metallo- β -laktamaz üreten suşların filogenetik ilişkileri tespit etmek amacıyla, PFGE ile elde edilen DNA profillerini değerlendirmek ve yorumlamak için bilgisayar programı yardımı ile benzerlik katsayısına dayalı küme (cluster) analizi yapılmıştır. Bu amaçla Gel-compar II software yazılım programı ile suşların benzerlik sınıflandırmasını gösteren soyağaçları (dendogram) elde edilmiştir. Suşlar arası ilişkinin değerlendirmesi için Gel-compar II software programı ile Dice benzerlik katsayısı kullanılmıştır. Dice benzerlik katsayısına göre, ≥ 85 benzerlik oranı, ≥ 3 bant farklılığına karşılık gelmektedir ve yakın ilişkili olarak değerlendirilmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda hastane ve toplum kökenli metallo- β -laktamaz üreten suşların filogenetik ilişkileri değerlendirildiğinde;

1. Metallo- β -laktamaz dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının (n:88) filogenetik ilişkileri irdelendiğinde, yakın ilişkili olarak 17 küme içerisinde dağıldıkları, bu küme içerisinde yer alan A1, A2, C1, D, F, H3, L1, N, O1, O2, P1, P2 ve R kümelerini oluşturan suşların %100 benzer oldukları, en büyük kümeyi 4 alt üye ile L kümesinin, (L1-%100, L1-L2 %96.8, L2-L3 %96, L3-L-4 %94), ikinci büyük kümeyi 4 alt üye ile C kümesinin (C1-%100, C1-C2 %95.8, C2-C3 %93.3, C3-C4 % 87.9) oluşturduğu tespit edilmiştir. PFGE yöntemiyle yakın ilişkili olarak değerlendirdiğimiz *Acinetobacter baumannii* izolatlarında β -laktamaz genlerinin dağılımını irdelediğimizde A kümesinde bulunan üyelerin OXA51-OXA24, B-C-D kümelerinde OXA51-OXA23-OXA24, E kümesi OXA51-TEM, F-G-H-I-J kümeleri OXA51-TEM-OXA23, K-N-O-P kümelerinde OXA51- OXA23, L kümesinde OXA51-OXA48- OXA23, M kümesinde ise OXA51-GES-OXA23 genlerinin yer aldığı tespit edildi. OXA-51 geni 88 *Acinetobacter baumannii* izolatında tespit edilmişti ancak yakın ilişkili izolatlarda ikinci sıklıkta OXA23 geni, daha sonra TEM ve OXA24 genlerinin izlediği görüldü. Ayrıca *Acinetobacter baumannii* izolatlarının hastanemizde persisite olduğu ve bu izolatların hastanemizin farklı kliniklerinde yerleştiği ve çeşitli hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olduğu tespit edildi.

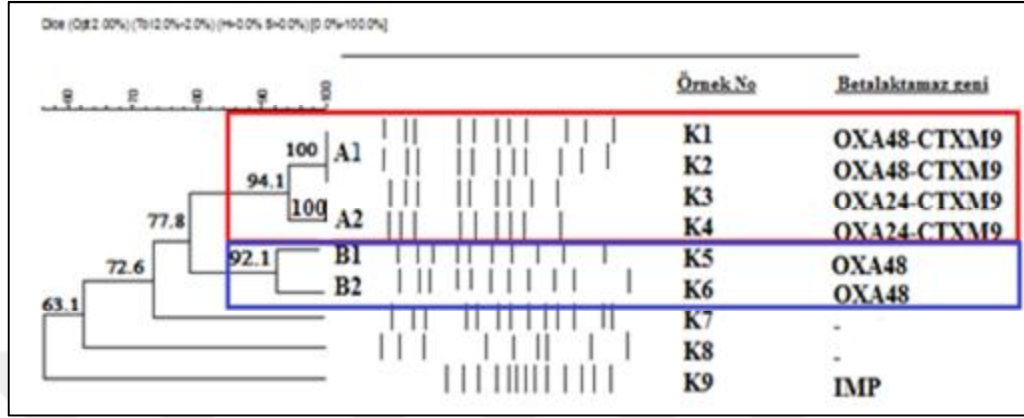
2. *P. aeruginosa* izolatlarının (n:26) filogenetik ilişkileri değerlendiriliğinde yakın ilişkili olarak 6 küme (A-B-C-D-E-F) içerisinde dağıldıkları, C1 kümesinin %100 benzer olduğu ve en büyük kümeyi oluşturan 3 alt üye (C1%100, C1-C2 %91.4) C kümesinin oluşturduğu analiz edilmiştir. Ayrıca C kümesinde yer alan üyelerin, OXA-48, D kümesinde GES, E ve F kümesinde bulunan üyelerin ise OXA-23 betalaktamaz genlerine sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 11. PFGE sonucu elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının filogenetik ilişkileri

3. Son olarak *K. pneumoniae* izolatlarının (n:9) filogenetik analizi sonucunda ise yakın ilişkili iki kümeye (A-B) dağıldıkları, en büyük kümeyi oluşturan dört üyeli A kümesinin alt üyesi olan A1 ve A2 kümesinin %100 benzer olduğu, A1 kümesinin A2 kümesiyle %94.1 oranla yakın ilişkili olduğu ve B kümesini oluşturan B1-B2 üyelerinin % 92.1 yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. A1 kümesinde yer alan üyelerde OXA48-

CTXM9, A2 kümesinde OXA24-CTXM9 ve B kümesinde yer alan üyelerde ise OXA48 betelaktamaz genlerinin dağıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 12. PFGE sonucu elde edilen *K. pneumoniae* filogenetik ilişkileri

5. TARTIŞMA

Antibiyotiklere karşı direnç gösteren bakteriler dünyada ve ülkemizde büyük sorun haline gelmiştir. Antibiyotiklerin yanlış ve bilinçsizce kullanımı çoklu dirençli Gram-negatif basiller gibi bakterilerin artmasına neden olmuştur. Özellikle Gram-negatif basillerde görülen β -laktam direnci en çok çalışılan ve en çok ilerleme kaydedilen alandır. β -laktam direncine yol açan mekanizmaların çoğu açıklığa kavuşturulmuş olup hücre duvarı modifikasyonlarına ek olarak en önemli direnç mekanizmasının enzimatik direnç olduğu tespit edilmiştir. B-laktamazlar ilk başlarda dar spektrumlu olmasına karşın, bütün β -laktamlara ve diğer antibiyotiklere direnç kazandırabilen enzimler haline gelmiştir ve spektrumu genişleyen bu enzimlere Genişlemiş Spektrumlu B-Laktamazlar ismi verilmiş ve daha sonra karbapenem grubu antibiyotikler ortaya çıkmıştır. Karbapenem grubu antibiyotikler günümüzde insanlığın bakterilere karşı verdiği mücadelede en gözde antibiyotikler arasında yerini almıştır. Ancak bakterilerin bu antibiyotiklere de direnç geliştirmesi uzun sürmemiştir. Karbapenem direncinden sorumlu mekanizmalar arasında karbapenemazlar enzimleri birinci sırada olmamakla birlikte aktarılabılır genlerle kodlandıklarından dolayı hızlı bir yayılım göstermektedir. Karbapenemazlar bazen klinisyenlere tedavide seçenek bırakmayacak kadar tehlikeli olabilen, direnç spektrumu çok geniş olabilen enzimlerdir ve günümüz mikrobiyoloji ve enfeksiyon araştırmacılarının en yoğun çalıştığı alandır. Ancak ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sayısı çok azdır.

Çalışmamızda tür tanımlama işlemlerinden sonra çalışmaya dahil edilen izolatlarda karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla yapılan MHT' i VITEK II sistemiyle karşılaştırılmıştır. VITEK II sistemi daha çok rutin laboratuvarlarda hızlı identifikasyon amacıyla kullanılan ve son geliştirmelerle direnç analizleride yapabilen bir sistemdir ancak karbapenem direnci konusunda VITEK II sisteminin çok fazla yanlış pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir⁷². Bunun yanında bazı enterik bakteri türlerinde imipenem ve meropenem karşı yanlış duyarlılık dereceleri verdiği de gösterilmiştir^{73,74}. Genellikle kabul görmüş olan doğru bir hastada karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık belirlendiğinde karbapenem direncinin mümkünse ilk önce hızlı moleküler testlerle doğrulanması eğer bu mümkün değilse MHT, APB, (3-aminophenylboronic acid)-Meropenem kombine disk, Dipikolinik asit- Meropenem kombine disk veya Imipenem-

EDTA kombine disk testlerinin en az ikisinde birden karbapenem direncinin gösterildikten sonra izolatu Karbapenem dirençli kabul etmektedir⁷⁵. MHT ise %95-100 gibi yüksek sensitivite oranlarına sahip ancak uygulama zorluğu ve bazı minör karbapenemaz genlerini kaçırabilme gibi dezavantajlara sahip bir fenotipik testtir bunun yanında bazı CTX-M veya AmpC tipi β -laktamaz sentezleyebilen izolatlarda azalmış veya kaybedilmiş porin ekspresyonu nedeniyle MHT spesifite oranlarını yanlış pozitif sonuçlarla düşürebilmektedir⁷⁵. Nordmann ve Poirel karbapenem direncinin belirlenmesi üzerine yaptıkları yoğun araştırmalar sonucu 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında kendi geliştirdikleri Carba NP ve SUPERCARBA testlerinin MHT'nin dezavantajlarını ortadan kaldırdığını ve rutinde bu testlerin kullanılmasını önermişlerdir⁷⁶.

Yang ve ark 10 yıllık bir surveyans çalışmasında 23 merkezde hem toplum kökenli hemde nozokomiyal kökenli 3074 *E. coli*, 1025 *K. pneumoniae* izolanda çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testleri yapmış, ertapenem, imipenem, amikasin ve piperasilin/tazobaktam'ın 10 yıl boyunca yüksek bir aktivite gösterdiğini ancak *E. coli* izolatlarında 10 yıl süresince sefalosporinlere, florokinolonlara ve ampisilin/sulbaktama karşı direncin dramatik bir şekilde arttığını bu veriler yanında çalıştıkları izolatlar arasında GSBL sentezleme oranının 2002-2003 yıllarında %19.1 iken 2010-2011 yıllarında bu oranın %66.6'ya yükseldiğini bildirmişlerdir⁷⁷. Coğrafik olarak bize yakın bir ülke olan Yunanistan'dan Falagas ve ark.'nın 2010 tarihli çalışmasında ise MDR (Multi Drug Resistant) ve XDR (Extremely Drug resistant) Enterobacteriaceae izolatlarıyla antibiyotik duyarlılığını araştırdıkları çalışmada en az 3 antibiyotik grubuna dirençli izolatları MDR, bir veya iki grup hariç diğer tüm antibiyotik gruplarına dirençli izolatları ise XDR olarak sınıflandırmış, MDR izolatlara karşı en etkili antibiyotikleri duyarlılık oranları sırasıyla fosfomisin (%92.8), tigesiklin (%92.1) ve kolistin (%73) olarak belirlemişler bunları imipenem (%35.5), tetrasiklin (%20.4), gentamisin (%19.7), trimetoprim/sülfametaksazol (%12.5) ve siprofloksasin (%10.5)'in izlediğini belirtmişlerdir⁷⁸. 2009'da Lee ve ark.'nın Tayvan' da imipenem'e duyarlılığını kaybetmiş *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik duyarlılığı araştırdıkları çalışmada izolatların sadece Tigesiklin ve Kolistin' e anlamlı derecede hassas bulunduğunu bildirmişlerdir⁷⁹. Türkiye'de ise henüz Karbapenem dirençli izolatların antibiyotik duyarlılıkları üzerine yapılmış geniş çaplı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu az

sayıdaki çalışmalardan biri olan Ergin ve ark.'nın 2013 yılında yayınladıkları makalede İstanbul'daki MDR *A. baumannii* izolatları çalışılmış ve izolatlarının %98'inin Kolisitin'e, %94'ünün Tigesiklin'e hassas olduğunu bu antibiyotikleri ise sırasıyla %17, %17 ve %18 oranları ile Imipenem, meropenem ve doripenem'in izlediğini bildirmişlerdir⁸⁰. Bir başka yerel çalışmada ise Sarı ve ark. 2013 yılında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesindeki bir MDR *A. baumannii* salgınına belirlemiş ve çalışılan izolatların tümünün Seftazidim, Imipenem, Meropenem, Piperasilin/Tazobaktam, Siprofloksasin, Gentamisin, Tobramisin, Trimetoprim/Sülfametaksazol ve Sefaperazon/Sulbaktam antibiyotiklerine dirençli olduklarını bildirmişlerdir⁸¹. Ankara'dan Kılıç ve ark.'nın 2011 yılında 7 aylık bir dönem sonunda 515 klinik Enterobacteriaceae izolatı arasından izole ettikleri 4 Karbapenem dirençli suşta yaptıkları antibiyotik duyarlılık testleri sonucu izolatlarının Amikasin' e %100, Aztreonam' a %50, Sefepim' e %50, Siprofloksasin' e %50, Levofloksasin'e %50, Kolistin'e ve Polimiksin B'ye %75, Tetrasiklin'e %50, Tigesiklin'e %100 ve Trimetoprim/Sülfametaksazol'e %50 duyarlı olduklarını bildirmişlerdir⁸². Bizim yaptığımız bu çalışmada meropenem'e % 99.23 (129/130), imipenem'e % 98.46 (128/130), siprofloksasin'e %88.46 (115/130), sefepim ve ampicillin-sulbactama % 86.92 (113/130) , tetrasiklin grubu antibiyotiklere %70 (91/130) ve Kolistine karşıda %5.38 (7/130) düzeyine direnç geliştiği tespit edildi.

Çalışmamıza dahil edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinin ardından sağlanan direncin genotipik temellerinin irdelenmesi amacıyla genotipik olarak bilinen karbapenemaz genleri araştırılmıştır. Direnç sağlayan genlerin identifikasyonu amacıyla ardarda yapılan Multiplex-PCR, in-house PCR ve dizi analizi çalışmaları sonucu çeşitli β -laktamaz genleri tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *A. baumannii* (n:88)izolatlarının tamamında, OXA-51-like (%100), 54 izolatta OXA-23-like (%61.36), 20 izolatta TEM (%22.73), 15 izolatta OXA-24-like (%17.04), 6 izolatta CTX-M (%6.82), 5 izolatta GES (%5.69), 3 izolatta OXA-48-like (%3.40), 2 izolatta NDM-1 (%2.28) tipi β -laktamaz enzimleri identifiye edilmiştir. Ülkemizde Ergin ve ark.'nın yaptığı geniş ölçekli araştırmada karbapenem direncine sebep olan genlerin %31 OXA-23-like, %23 OXA-58-like kalanlarında OXA-51-like olduğu, izolatların %54' ünde genlerin birarada aynı izolatta bulunduğunu bildirmişlerdir⁸⁰. Ergin ve ark.'nın yaptığı bu çalışma bizim çalışma ile

kıyasladığımızda OXA-51-like ve OXA-23-like genin yıllar içerisinde daha prevalan hale geçtiği görülmüştür. Bizim çalışmamızdaki bir diğer ilginç bulgu 5 izolatta (%5.69) GES-11 tipi A grubu karbapenemazın tespit edilmesi idi. Ülkemizdeki ilk GES enzimini üreten izolat Belçika'ya transfer olmuş bir hastada Bogaerts ve ark. tarafından 2010 yılında gösterilmiştir⁸³. Daha sonra 2013 yılında Cicek ve Zeka'nın grubları tarafından iki farklı araştırmada *A. baumannii* izolatları tarafından GES enzimi sentezlendiği bildirilmiştir^{84,85}. Bu çalışmalarda identifiye edilen GES enzimlerinin subtipleri GES-11 ve GES-12 idi. Bizim çalışmamızda izole ettiğimiz 5 GES-11 sentezleyen izolatla birlikte düşünüldüğünde ülkemizde GES enzimi sentezleyen *A. baumannii* izolatlarının varlığının göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmelidir. Bizim çalışmamızdaki *A. baumannii* izolatları düşünüldüğünde görülen yüksek direnç oranlarını sağlayan mekanizmalar ya aktivitesi yüksek karbapenemaz genleri yada kombine halde bulunan daha düşük aktiviteli β -laktamazlar sayesinde geliştiği yorumlanabilir ancak ileride karbapenemaz genlerinin karakterizasyonu yanında porin proteinlerinin geçirgenliğine ve efflux sistemlerine yönelik çalışmalar yapılması bu mekanizmaların aydınlatılabilmesi açısından önemlidir.

Çalışmamıza dahil edilen bir başka non-fermentatif Gram-negatif basil morfolojisindeki tür *P.aeruginosa* idi. Bu türde identifiye edilen β -laktamaz genleri sayısı ve sırası ile şu şekilde idi: 4 izolatta OXA-23-like, 4 izolatta OXA-48, 1 izolatta GES-11, 1 izolatta GES-12, 1 izolatta CTX-M, 1 izolatta VIM-1 geni tespit edilmiştir. Breidenstein ve ark. *P.aeruginosa*'daki direnç üzerine yaptıkları literatür derlemesinde bu mikroorganizmanın diğer Gram-negatif basillere göre antimikrobiyallere çok daha dirençli olmasının sebebini intrinsik olarak bulundurdıkları azalmış dış membran geçirgenliği, gelişmiş efflux sistemleri, diğer bakterilerden farklı porin sayı ve yapıları gibi çeşitli direnç mekanizmalarına bağlamıştır⁸⁶. Örneğin *P.aeruginosa* hücre duvarı *E.coli*'ye göre 12-100 kat daha az geçirgen olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur⁸⁷. Fernandez ve ark. ise *P.aeruginosa*'yı bu yeteneklerinin yanı sıra antibiyotik baskısı, besin azlığı, yetersiz üreme ortamı gibi çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı diğer bakterilere göre daha iyi uyum sağlayabilen bir mikroorganizma olarak tanımlamıştır⁸⁸. Bu tür değişimler genomda bulunan *crc*, *lon*, *psrA*, *ampD*, *gyrA*, *nalA*, *nfxB*, *mexZ*, *phoQ* gibi genlerle kontrol edilmektedir⁸⁶. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda 26 *P. aeruginosa* izolatının 11' inde β -laktamaz

genlerinin identifiye edilmiş olmasının sebebi olarak, suşlarda görülen karbapenem direncinin mekanizmalarının enzimatik direnç dışındaki efflux sistemleri yada membran geçirgenliği modifikasyonları ile olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda tanımlanan A sınıfı karbapenemaz olan GES enzimi 2 izolatta tanımlanmış subtip dağılımı 1 izolatta GES-11, 1 izolatta ise GES-12 şeklinde belirlenmiştir. GES enzimleri daha önce ülkemizde birkaç çalışmada *A. baumannii* izolatlarında gösterilmiş^{83,85}, ancak *P. aeruginosa* suşları için yapılan literatür taramasında ülkemizde Güran ve ark. tarafından 2014 yılında yaptıkları çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında GES enziminin varlığını ilk kez tespit etmişlerdir⁶⁸. Dünyadaki çalışmalara bakıldığında *P.aeruginosa* suşlarında GES enzimlerinin yaygın olduğu pek çok çalışmayla gösterilmiştir^{89,90}. Bizim çalışmamızdaki %7.70' lik oran, Güran ve ark. tarafından %8.2' lik oranla yaptıkları çalışmanın ardından GES enziminin ülkemizde prevalan olduğu sonucuna varılabilir. Bir diğer MBL olan VIM enzimi (VIM-5) ise ülkemizde ilk kez Bahar ve ark. tarafından 2004 yılında tanımlanmıştır. Dünyada IMP ile birlikte en sık *P. aeruginosa* türlerinde görülen MBL olan VIM enzimleri daha sonra 2008'de Yakupogullar ve ark. ve Poirel ve ark. tarafından gösterilmiş dolayısı ile bu enzimlerin varlığı ülkemizde bilinmektedir. Güran ve ark. tarafından yapılan çalışmada Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşları için giderilmiş VIM enzimlerinin prevelansı %5.5 olarak tespit edilmiştir⁶⁸. Bizim çalışmamızda tanımlanan VIM-1 subtipinde enzim prevelansı %3.85 olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen Karbapenem dirençli 9 *K. pneumoniae* izolatlarının 4'ünde OXA-48 (%44.44), 2'sinde OXA-24 (%22.22), 4' ünde CTX-M (%44.44) ve 4' ünde CTX-M9 genleri tanımlanmıştır. Güran ve ark. 2011 yılında yaptığı bir çalışmada Toplum kökenli *K. pneumoniae* izolatlarında CTX-M genlerinin sıklığı % 88,8 olarak tespit etmişler⁹¹ ancak 2014 yılında yaptıkları benzer çalışmada Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları arasındaki toplam CTX-M sıklığını %52 (13/25) olarak bulmuşlardır⁶⁸. Bizim yaptığımız bu çalışmada ise CTX-M sıklığı % 44.44 bulunmuştur. Çalışmamızdaki *K. pneumoniae* izolatlarında en sık görülen β -laktamaz genleri %44.44 oranlarıyla OXA-48 ve CTX-M genleri idi. Alp ve ark. 2013 yılında Karbapenem dirençli 94 *K. pneumoniae* izolatlarında yaptıkları epidemiyolojik araştırmada OXA-48 gen prevelansının %91.5 olduğunu bildirmişlerdir⁹². Nazik ve ark. ise 2011 yılında 22 izolatla yaptıkları çalışmada *K. pneumoniae* izolatları arasında

OXA-48 gen prevalansının %100, 2012 yılındaki çalışmalarında ise 10 *K. pneumoniae* izolatının 8'inde (%80) OXA-48 geni bildirmişlerdir^{93,94}. Yine Kilic ve ark.'nın 2011 tarihli yayınında karbapenem direnci tespit edilen 3 *K. pneumoniae* izolatının 3'ünde OXA-48 genlerini tespit etmişlerdir⁸².

Çalışmamızdaki 3 *E.coli* izolatlarının bir tanesinde NDM-1, 2 izolatta oxa 48 like geni hem multiplex-PCR ile hemde dizi analiziyle tespit edilmiştir. Türkiye'de ilk kez bir *K. pneumoniae* izolatında 2001 yılında tanımlanan OXA-48 enzimi daha sonraki yıllarda çeşitli Enterobacteriaceae türlerinde ve *E. coli*'de gösterilmiştir^{82,95}. Türkiye OXA-48 enzimi için artık endemik kabul edilen bir ülkedir ve bu enzimi taşıyan kökenlerin artık toplum içerisinde sirkülasyona girdiği belirtilmektedir⁹⁶. Çalışmamızda ayrıca 1 *Enterobacter cloacae* izolatında NDM-1, OXA 48 like ve CTX-M1 genleri tanımlanmıştır.

Günümüzde karbapenemaz enzimleri tüm dünyaya yayılmış bir şekilde toplumu tehdit etmektedir. Karbapenemaz enzim tiplerinin, tercih edilen antibiyotiklerin kullanım sıklıklarına bağlı olarak bölgeler veya ülkeler arası farklılıklar göstermektedir. Karbapenemaz enzimi üreten suşların toplum ve hastane içerisindeki hareketlerini izleyecek genotip düzeyinde hızlı sonuç veren moleküler epidemiyolojik metodların yardımı ile hareket alanının sınırlandırılması ve yeni direnç gelişiminin minimize edilmesi gerekmektedir. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda prevalans sonuçları incelendiğinde, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere bir çok ülkede gerek hastane gerekse toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilen Gram-negatif basillerde karbapenemaz enzimi üreten suşların prevalansında büyük artış olduğu görülmüştür.

Yang ve arkadaşlarının Kore'de Karbapenem dirençli 49 *A.baumannii* izolat ile 2009 yılında yaptıkları çalışmada, PFGE yöntemi ile suşların tamamının klonal ilişkili olduğu belirlenmiştir⁹⁷. Buna karşın, Pournaras ve arkadaşlarının Yunanistan'da yaptıkları çalışmada 17 Karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatının PFGE ile incelenmesi sonucu 6 farklı klon tespit etmişlerdir⁹⁸. On ülkeyi kapsayan (Çin, Hindistan, Endonezya, Tayland, Kore, Taiwan, Singapur, Austuralya, Hong Kong ve Filipinler) 2009 yılı SENRTY surveyans çalışmasında özellikle OXA-23 geni taşıyan Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının PFGE çalışması sonucunda bu ülkeler için epidemik bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır⁹⁹. Amerika'da yapılan başka

bir çalışmada ise benzer şekilde OXA-23 geni taşıyan Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastane enfeksiyonları için önemli bir tehdit olduğu ifade edilmiştir¹⁰⁰. *A. baumannii* izolatlarının prevalansına ülkemizde yapılan çalışmalarda; Ergin ve arkadaşları kan kültüründen izole ettikleri çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatlarında %31 oranında OXA-23like ve %23'ünde OXA-58like geni varlığı belirlemişlerdir. Yedi yıllık verilerin değerlendirildiği çalışmada OXA-23 oranının yıllar içinde artış gösterirken, OXA-58 geninde ise baskılanmanın olduğu gözlemlenmiştir. Klonalite çalışmasının REP-PCR ile yapıldığı bu çalışmada uzun dönem varlığını sürdüren çok varyantlı patern tespit etmişlerdir⁸⁰. Vahapoğlu ve ark (2006)'nın altı merkezden elde ettikleri 72 Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatı ile yaptıkları çalışmada PFGE ve plasmid analiz çalışması sonucunda, genlerin plasmid kaynaklı olup, çoklu klonalite gösterdiği ifade edilmiştir¹⁰¹.

Güney Kore'de yapılmış bir çalışmada ülke genelinden 664 *P. aeruginosa* izolatı toplanmış ve izolatların 224'ünde karbapenem direnci tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli izolatların 35'inde IMP-6 tespit edilmiştir. IMP pozitif 35 izolatın hepsi PFGE ile %85 ve üzerinde klonal ilişkili bulunmuştur. Ülke genelinde tek bir izolatın yayılım göstermiş olduğu görülmüştür¹⁰². Pitout ve ark. 2002-2006 yılları arasında üçü erişkin biri pediatrik olmak üzere dört farklı hastaneden toplanmış 518 tanesi hasta örneklerinden 10 tanesi çevre örneklerinden izole edilmiş 528 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL üretimini ve klonal ilişki varlığını araştırmışlardır. 178 izolatta VIM-2, yedi izolatta ise IMP-7 tespit etmişlerdir. 178 VIM pozitif izolat iki yakın ilişkili patern göstermiştir ve bunların 154'ü bir grup oluştururken 21'i farklı bir grup oluşturmuştur. Üç VIM pozitif izolatın ise bu paternler ile ilişkisiz olduğunu tespit etmişlerdir. IMP pozitif izolatların ise bu gruplardan farklı bir grupta olduğunu bildirmişlerdir¹⁰³.

Bizim de hastane ve toplum kökenli karbapenemaz enzimi üreten suşların prevalansını ve hareketlerini izlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada *Acinetobacter baumannii* izolatlarının (n:88), yakın ilişkili olarak 17 küme içerisinde dağıldıkları, bu küme içerisinde yer alan A1, A2, C1, D, F, H3, L1, N, O1, O2, P1, P2 ve R kümelerini oluşturan suşların %100 benzer oldukları ve en sık dağılan betalaktamaz genlerinin OXA-51, OXA-23, TEM, OXA-24 olduğu, *P. aeruginosa* izolatlarının (n:26) yakın ilişkili olarak 6 küme (A-B-C-D-E-F) içerisinde dağıldıkları, C1 kümesinin %100

benzer olduğu, C kümesinde yer alan üyelerin, OXA-48, E ve F kümesinde bulunan üyelerin ise OXA-23 betalaktamaz genlerine sahip olduğu, *K.pneumoniae* izolatlarının (n:9) ise yakın ilişkili iki kümeye (A-B) dağıldıkları, en büyük kümeyi oluşturan dört üyeli A kümesinin alt üyesi olan A1 ve A2 kümesinin %100 benzer olduğu, yakın ilişkili *K.pneumoniae* izolatlarında OXA48-CTXM9 betalaktamaz genlerinin bulunduğu tespit edildi.

Yaptığımız bu çalışmanın sonucu doğrultusunda tüm dünyada olduğu gibi bölgemizde de klinik öneme sahip non-fermenter basil ve Enterobacteriaceae suşları arasında neredeyse tüm antibiyotiklere karşı yüksek derecede direnç olduğu belirlenmiş, karbapenemaz aktivitesine sahip suşların prevalansında artış olduğu, tedavisi çok zor NDM-1 tipi karbapenemaz sentezleyen suşların ülkemizde arttığı görülmüştür. Bu bağlamda bölgemizde veya her ülkede yapılacak epidemiyolojik sürveyans çalışmaları verileri dikkate alınarak acil önlem alınması, yeni ve daha etkinli kontrol tedbirlerinin geliştirilmesi, mevcut kontrol tedbirlerinin de gözden geçirilerek revize edilmesi ve geleceğe dair daha akılcı, disipline dayalı stratejiler geliştirilip uygulanması çözüm için azami gereklidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bölgemizdeki hastalardan izole edilen Karbapenem dirençli Gram-negatif basillerde fenotipik-genotipik yöntemlerle MBL'ların varlığının araştırılması, metallo- β -laktamaz üreten suşların prevalansı, direnç neden olan enzimlerin hastane veya toplum kökenli olanları ayrıştırılarak filogenetik ilişkileri tespiti ve muhtemel kaynakların belirlenerek bulaş zincirinin kırılmasında faydalı olacak veri sağlanması amacıyla yapılan bu tez çalışması sonunda;

1. Çalışmaya dahil edilen suşlar arasında meropenem'e % 99.23, imipenem'e % 98.46, siprofloksasin'e %88.46, sefepim ve ampisillin-sulbactama % 86.92, tetrasiklin grubu antibiyotiklere %70 ve Kolistine karşıda %5.38 düzeyine direnç geliştiği,
2. Bu direncin genetik mekanizmalarının irdelenmesi sonucunda tüm izolatlarda en sık görülen karbapenemaz genlerinin, OXA-51 OXA -23-Like ve OXA-24-Like gibi D grubu karbapenemazları kodlayan genlerin görüldüğü bunları TEM ,CTX-M, OXA-48-Like enzimlerini kodlayan genlerin izlediği ve bazı izolatlarda GES, NDM enzimleri ve son olarakta *P.aeruginosa* izolatında VIM gibi enzimleri kodlayan gen ekspresyonunun görüldüğü,
3. Bölgemizde klinik öneme sahip non-fermenter basil ve Enterobacteriaceae suşları arasında neredeyse tüm antibiyotiklere karşı yüksek derecede direnç olduğu, tedavi edilemeyen infeksiyonlarda ise Kolistin' in son seçenek olarak kullanılabileceği,
4. Çalışmamızda suşların klonal ilişkisini irdelediğimizde *Acinetobacter baumannii* izolatlarının (n:88), yakın ilişkili olarak 17 küme içerisinde dağıldıkları, bu küme içerisinde yer alan A1, A2, C1, D, F, H3, L1, N, O1, O2, P1, P2 ve R kümelerini oluşturan suşların %100 benzer oldukları ve yakın ilişkili izolatlar en sık dağılan betalaktamaz genlerinin OXA-51, OXA-23, TEM, OXA-24 olduğu, *P. aeruginosa* izolatlarının (n:26) yakın ilişkili olarak 6 küme (A-B-C-D-E-F) içerisinde dağıldıkları, C1 kümesinin %100 benzer olduğu ve ayrıca C kümesinde yer alan üyelerin, OXA-48, E ve F kümesinde bulunan üyelerin ise OXA-23 betalaktamaz genlerine sahip olduğu, *K. pneumoniae*

izolatlarının (n:9) ise yakın ilişkili iki kümeye (A-B) dağıldıkları, en büyük kümeyi oluşturan dört üyeli A kümesinin alt üyesi olan A1 ve A2 kümesinin %100 benzer olduğunu ve yakın ilişkili olarak değerlendirdiğimiz *K.pneumoniae* izolatlarında OXA48-CTXM9 betalaktamaz genlerine de sahip olduğu,

5. PFGE yöntemiyle yakın ilişkili olarak değerlendirdiğimiz klonların persiste olduğunu, bu klonların hastanemizin farklı kliniklerinde yerleştiğini ve çeşitli hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olduğu,
6. Persiste izolatların hastane içi hareketlerinin takibinin istikrarlı bir şekilde sürdürülmesi, persistansının önlenmesi amacıyla gerekli önlemlerin alınması ve sürveyans çalışmalarının daha kapsamlı yapılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak ülkemizde yapılan/ yapılacak epidemiyolojik sürveyans çalışmaları verileri dikkate alınarak acil önlem alınması, epidemiyolojik çalışmaların artırılmasının yanısıra direnç ve yayılım mekanizmaları üzerine yoğunlaşan çalışmaların desteklenerek sayısının ve kalitesinin artırılması gerektiği, geleceğe dair rasyonel ve disipline dayalı stratejiler geliştirilip uygulanması kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Gür D, Ünal S.** Resistance to antimicrobial agents in Mediterranean countries. *Int J Antimicrob Agents*, **2001**;17(1):21-26.
2. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*, 2007;74:1686-701.
3. **Öztürk CE, Türkmen Albayrak H, Altınöz A,** Ankaralı H. Pseudomonas aeruginosa suşlarında antibiyotiklere direnç ve beta laktamaz oranları. *Ankem Derg.* **2010**;24(3):117-123.
4. **Gülay Z.** Gram negatif bakterilerdeki moleküler direnç mekanizmaları. In: Yüce A, Çakır N (Eds). *Hastane enfeksiyonları.2. baskı.* İzmir: güven kitabevi, 2009;149-79.
5. **Arman D.** Yoğun bakımda gram negative bakteri sorunu. *Ankem derg*, 2009;23:148-56.
6. **Eser ÖK, Kocagöz S, Ergin A, Altun B, Haşcelik G.** Yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon etkeni olan Gram negatif basillerin değerlendirilmesi. *Enfeksiyon Derg*, 2005;19-80.
7. **Erkoç F.** Türkmenoğlu F. Enterobacteriaceae Genel Özellikleri, *Gazi Eğitim Fakültesi*, Ankara, 2007.
8. **Goossens H, Grabein B.** Prevalance and antimicrobial susceptibility data for extended spectrum beta-lactamase and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004) *Diagn Microbiol infect Dis*, 2005;53:257-64.
9. **Livermore DM, Hawkey PM.** CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **2005**;56:451-4.
10. **Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS.** Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, **2009**;48: 1-12.
11. **McGowan JE.** Resistance in nonfermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*, **2006**;119:29-36.
12. **Fidan I, Gürelik FÇ, Yüksel S, Sultan N.** Pseudomonas aeruginosa suşlarında antibiyotik direnci ve metallo- β -laktamaz sıklığı. *Ankem Derg*, **2005**; 19:68-70.
13. **Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al.** Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in gram negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*, **2007**;29:380-8.
14. **Altunçekiç A, Arman D.** Acinetobacter cinsi bakterilerin mikrobiyolojisi, direnç mekanizmaları ve çoklu dirençli suşlarda tedavi. Arman D, Ünal S (Eds). Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar. *Bilimsel Tıp*, Ankara, **2009**;123-36.
15. **David M., Livermore and Neil Woodford.** The β - Lactamase Threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter, *Trends in Microbiology*, **2006**; Vol.14 No:9.
16. **Essack SY.** The Development of Beta-Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of Beta-Lactamases, *Pharmaceutical Research*, **2001**;18:1391-9.
17. **Ayaz C.** Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi .3. baskı. *İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri*, **2008**; 266-78.
18. **Ghosh AS, Melquist AL, Young KD.** Loss of O-antigen increases cell shape abnormalities in penicillin-binding protein mutants of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett.* **2006**; 263: 252-7.

19. **Yıldırım A.** Extended spectrum B-lactamase (GSBL) Araştırma yöntemlerinin karşılaştırılması: E.coli ve klebsiella spp. Suşlarında sıklığının saptanması. *Uzmanlık tezi, gülhane askeri tıp akademisi*, İstanbul.1999.
20. **Özsoy FM,  nc l O, Yıldırım A, Pahsa A.** genişletilmiş spektrumlu b-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar . *Flora dergisi*, 2001;6:3-21.
21. **Sanders CC, Sanders WE.** Beta lactam resistance in gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin infect dis*, 1992; 14: 1089-1099.
22. **Jehl F., Chomarat M., Weber M., Gerard A.** Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye, Biomerieux Yayınları, 2003.
23. **G r D.** Gram negatif Bakterilerde Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları, In: Ulusoy S., Leblebicioğlu H., Arman D. (edit rler), * nemli ve Sorunlu Gram negatif Bakteri İnfeksiyonları*, Ankara, 2004;69-83.
24. **Delcour AH.** Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1794(5): 808-16.
25. **Hasdemir U.** The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. *Mikrobiyol Bul*, 2007; 41(2): 309-27.
26. **Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P.** Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42(2): 129-33.
27. **Martínez-Martínez L.** Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14 (Suppl 1): 82-9.
28. **Bradford PA.** Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21 st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat, *Clin Microbiol Rev*, 2001;14:933-51.
29. **Pool K.** Resistance to Beta-Lactam Antibiotics, *Cell mol life sci*, 2004;61:2200-23.
30. **Li XZ, Nikaido H.** Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* ,2009; 69(12):1555-623.
31. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-Spectrum  -Lactamases: A Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*, 2005; 18 (4): 657 86.
32. **G r D.**   -Laktamazlar, *Flora Dergisi*, 1997;1-18.
33. **Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA.** A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and its Correlation with Molecular Structure, *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39:1211-33.
34. **G r D.**   - Laktamazlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002; 33(2):102-109.
35. **Basoli A., Az M., Mazzocchi P., Speranza V.** Imipenem/Silastatin (1.5g daily) Versus Meropenem (3.0g daily) in Patient with Intraabdominal Infections: Results of Prospective, Randomized, Multicentre Trial, *Scand J Infect Dis.*, 1997; 29:503-8.
36. **Livermore DM.** Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance, *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8:557-84.
37. **Yuluğ N.** Beta-Laktamazlar ve Klinik A ıdan  nemi, *ANKEM Dergisi*, 1997; 11:205-5.)

38. **Livermore DM.** Beta-Lactamase Mediated Resistance and Opportunities for its Control, *J. Antimicrob Chemother*, **1998**. 41(suppl D):24-41.
39. **Danel F., Hall LMC., Gür D., Akalın HE., Livermore DM.** Transferable Production of PER-1 Beta-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother.*, **1995**; 35:281-94.
40. **Vahapoğlu H., Hall LM., Mülazımoğlu L., et al.** Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins, Caused By PER-1 Beta-Lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey, *J Med Microbiol.*, **1995**; 43:294-9.
41. **Hall LMC., Livermore DM., Gür D., Akova M., Akalın HE.** OXA-11, An Extended Spectrum Variant of OXA-10(PSE-) Beta-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother.*, **1993**; 37:1637-44.
42. **Nordmann P. ve Poirel L.** Emerging Carbapenemases in Gram Negative Aerobes, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2002**; 8:321-331.
43. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo- β -Lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**;18: 306–325.
44. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- β lactamases: a last frontier for β -lactams, *Lancet Infectious Diseases*, **2011**;11: 381–93.
45. **Gupta V.** Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Expert Opin Investig Drugs*, **2008**;17: 131-143.
46. **Maltezou HC.** Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2009**;33: 405-7.
47. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **2010**; 54: 969–976.
48. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**;41: 223-232.
49. **Bush, K.** Metallo- β -Lactamases: A Class Apart, *Clin. Infect. Dis.*, **1996**; 27:S48-S53.
50. **Lee, K., Shin HB., Kim YA., Young D., Yum JM.** Modified Hodge and EDTA-Disk Synergy Tests to Screen Metallo-Beta-Lactamase Producing Strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter species*, *Clin Microbial Infect.*, **2001**; 7:88-91.
51. **Rasmussen BA., Bush K.** Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamases, *Antimicrob Agents Chemother.*, **1997**;41:223-32.
52. **Amyes SGB.** Carbapenemases. *ANKEM Dergisi*, **1997**;11(2):221-5.
53. **Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y.** Novel aquired metallo- β -lactamase gene, *bla* (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:4485-4491.
54. **Strateva T, Yordanov D.** *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* **2009**;58(9):1133-1148.
55. **Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S et al.** Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* **2003**;37(1):26-32.

56. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM.** Cloning and characterization of *bla* VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**;43:1584-1590.
57. **Poirel L, Collet L, Nordmann P.** Carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect. Dis.*, **2000**;6:84-85.
58. **Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR.** Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2003**;47:582-587.
59. **Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al.** Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*, **2002**; 50(5):673-679.
60. **Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR.** Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**;48:4654-4661.
61. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, No:33, İstanbul, **1997**.
62. **Dolapçı İ.** Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar: Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tedavi ve Enfeksiyon Kontrolündeki Roller, *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2005**; 39:229-240.
63. **Franklin C., Liolios L. ve Peleg Y.** (Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in Clinical Laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**; 3139-3144.
64. **Shibata N., Doi Y., et all.** PCR Typing of Genetic Determinats for Metallo- β -Lactamases and Integrases Caried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron, *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**; p.5407-5413.
65. **Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi T., Fujiwara H., Goto M.** Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**; p. 40-43.
66. **Yong D., Lee K., Yum JM., Shin HB., Rossoloni GM., Chong Y.** Imipenem –EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β - Lactamase Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*, *J Clin Microbiol.*, **2002**; 40:3798-3801.
67. **Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** Comparison of the double-disk, combined disk, and E- test methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram negative bacili, *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2004**;49(1):5-11.
68. **Mümtaz Güran,** Klinik Örneklerden izole edilen Karbapenem dirençli gram olumsuz basillerde karbapenem direncinin moleküler analizi. *Doktora tezi* .Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana. **2014**.
69. **Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, **2010**; 65: 490-5.
70. **Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA.** A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, **2011**; 37: 356-9.
71. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20: 440–458.

72. **Winstanley T, Courvalin P.** Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, **2011**; 24: 515-56.
73. **Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC.** Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa isolates. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41: 351–358.
74. **Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC.** Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2000**; 38: 59–67.
75. **Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms.** Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**; 36: 205-10.
76. **Nordmann P, Poirel L.** Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, **2013**; 68: 487-9.
77. **Yang Q, Zhang H, Wang Y, Xu Y, Chen M, Badal RE, Wang H, Ni Y, Yu Y, Hu B, Sun Z, Huang W, Wang Y, Wu A, Feng X, Liao K, Shen D, Hu Z, Chu Y, Lu J, Cao B, Su J, Gui B, Duan Q, Zhang S, Shao H, Kong H, Hu Y, Ye H.** A 10 year surveillance for antimicrobial susceptibility of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in community- and hospital-associated intra-abdominal infections in China. *J Med Microbiol*, **2013**; 62: 1343-9.
78. **Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G.** Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**; 35: 240-3.
79. **Lee YT, Huang LY, Chiang DH, Chen CP, Chen TL, Wang FD, Fung CP, Siu LK, Cho WL.** Differences in phenotypic and genotypic characteristics among imipenem-non-susceptible Acinetobacter isolates belonging to different genomic species in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*, **2009**; 34: 580-4.
80. **Ergin A, Hascelik G, Eser OK.** Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive Acinetobacter baumannii isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **2013**; 45: 26–31.
81. **Sarf AN, Biçmen M, Gulay Z.** The First Report on the Outbreak of OXA-24/40-Like Carbapenemase-Producing Acinetobacter baumannii in Turkey. *Jpn J Infect Dis*, **2013**; 66: 439-442.
82. **Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC.** Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates in Turkey. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **2011**; 41:2-11.
83. **Bogaerts P, Naas T, Garch FE, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissioir B, Nordmann P, Glupczynski Y.** GES Extended-Spectrum β -Lactamases in Acinetobacter baumannii Isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2010**; 11: 4872–4878.
84. **Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, Bonnin RA, Arda B, Ozinel M, Ulusoy S, Bor C, Nordmann P.** GES-type and OXA-23 carbapenemase producing Acinetobacter baumannii in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, **2013**; Nov 19.
85. **Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, Sandalli C.** OXA and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*, **2013**; 7: 1469-0691.

86. **Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE.** Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, **2011**; 19: 419-26.
87. **Hancock REW.** Resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis*, **1998**; 27: 93–99.
88. **Fernández L, Breidenstein EB, Hancock RE.** Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat* **2011**; 14: 1-21.
89. **Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM.** GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**; 57: 396-401.
90. **Girlich D, Poirel L, Szczepanowski R, Schlüter A, Nordmann P.** Carbapenem-hydrolyzing GES-5-encoding gene on different plasmid types recovered from a bacterial community in a sewage treatment plant. *Appl Environ Microbiol*, **2012**; 78: 1292-5.
91. **Guran M.** Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae izolatlarında CTX-M tipi Geniş Spektrumlu B-Laktamaz genlerinin PCR, PCR-RFLP, Dizi Analizi yöntemleri ile identifikasyonu ve suşlar arasındaki klonal ilişkinin PFGE yöntemi ile belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana. **2011**.
92. **Alp E, Perçin D, Colakoglu S, Durmaz S, Kürkcü CA, Ekincioğlu P, Güneş T.** Molecular characterization of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*, **2013**; 84: 178-80.
93. **Nazik H, Ongen B, Ilktac M, Aydın S, Kuvat N, Sahin A, Yemisen M, Mete B, Durmus MS, Balkan II, Yildiz I, Ergul Y.** Carbapenem resistance due to Bla(OXA-48) among ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in a university hospital, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **2012**; 43: 1178-85.
94. **Nazik H, Öngen B, Mete B, Aydın S, Yemis M, Kelesoglu MF, Ergul Y, Tabak F.** Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-I β -cr Genes in Klebsiella pneumoniae Isolates from Istanbul, Turkey. *The Journal of International Medical Research*, **2011**; 39: 1932-1940.
95. **Gülmez D, Woodford N, Palepou MF.** Carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**; 31: 523–526.
96. **Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*, **2012**; 18: 413-31.
97. **Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM.** Outbreaks of imipenem resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 B-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J*. **2009**; 50(6):764-770.
98. **Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis N, Legakis NJ, Tsakris A.** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2006**; 57:557-561.
99. **Mendes RE, Bell J M, Turnidge J D, Castanheira M and Jones R N.** Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among Acinetobacter spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2009**; 63, 55–59.

100. **Srinivasan V B, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M and Gebreyes W A.** Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2009**; 8:21.
101. **Vahaboğlu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolaylı F, Eroğlu C.** High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**; 58, 537–542.
102. **Yoo JS, Yang JW, Kim HM, Byeon J, Kim HS, Yoo J Il, Chung GT, Lee YS.** Dissemination of genetically related IMP-6-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in South Korea. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2012**;39: 300–304.
103. **Pitout JDD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL.** Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *Journal Of Clinical Microbiology* , **2007** 45: 294–298.

ÖZGEÇMİŞ

İran’da 11.09.1981’de doğdu. İlköğrenimini Farhangiyan İlkokulu’nda, ortaöğrenimini Taleghani’de ve lise öğrenimini İmam Khomeyni’de tamamladı. Lisans eğitimini Arak Azad Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümü’nde 2005’de; yüksek lisans eğitimini Zanjaan Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2007’de tamamladı. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2012’de doktora programına başladı. 2014 yılında Erasmus programı ile Palermo Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda beş ay eğitim aldı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.