

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

**KARBAPENEMLERE DİRENÇ GÖSTEREN GRAM  
NEGATİF BAKTERİLERDE METALLO-BETA-  
LAKTAMAZ ENZİMİNİN FENOTİPİK OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

**Pınar ALTINTOP**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Akgün YAMAN**

**ADANA-2015**

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

**KARBAPENEMLERE DİRENÇ GÖSTEREN GRAM  
NEGATİF BAKTERİLERDE METALLO-BETA-  
LAKTAMAZ ENZİMİNİN FENOTİPİK OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

**Pınar ALTINTOP**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Akgün YAMAN**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF2012D6  
Nolu proje ile desteklenmiştir.**

**ADANA-2015**

## KABUL VE ONAY


**Tıbbi Mikrobiyoloji** Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“ Karbapenemlere direnç gösteren Gram negatif bakterilerde Metallo-Beta-Laktamaz enziminin fenotipik  
olarak araştırılması ”  
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tarihi:** 29 /01/2015

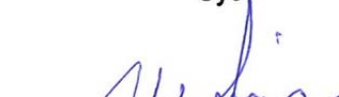
### TEZ SINAV JÜRİSİ

  
Prof. Dr. Akđun Yaman  
Çukurova Üniversitesi  
**Başkan**

  
Prof. Dr. Fatih Köksal  
Çukurova Üniversitesi  
**Raportör**

  
Prof. Dr. Fügen Yarkin  
Çukurova Üniversitesi  
**Üye**

  
Prof. Dr. Yeşim Taşova  
Çukurova Üniversitesi  
**Üye**

  
Prof. Dr. Mehmet Sami Serin  
Mersin Üniversitesi  
**Üye**

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĐAN  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım, tezimin belirlenmesinde ve yürütülmesinde büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bana destek olmaktan hiçbir zaman kaçınmayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Akgün Yaman'a, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Köksal'a, Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, Prof Dr. Macit İlkit'e, Yrd. Doç. Dr. Filiz Kibar'a, ve bölümümüzün diğer öğretim üyelerine, çalışma dönemimin bir kısmını geçirdiğim İtalya'da Dr. Alessandra Carattoli, Dr.Daniela Fortini, Dr. Aurora Garcia Fernandez ve çalışma grubuna, eğitimim boyunca aynı sıcak ortamı paylaştığım ve çalışma arkadaşlarıma ve doktora öğrencisi Yağmur Ekenoğlu'na, bölümümüz sekreteri Suna Gökmen'e ve Merkez Laboratuvarı personellerine, ayrıca sadece eğitim dönemde değil tüm hayatım boyunca sevgi, saygı, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen hayattaki en değerli varlıklarım olan anneme, babama ve kardeşlerime en içten duygularıyla sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

**PINAR ALTINTOP**

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ÖZET</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Hastane Enfeksiyonları	3
2.2. Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotik Direnci	3
2.3. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler	4
2.4. Karbapenemler	5
2.4.1. İmipenem	6
2.4.2. Meropenem	8
2.4.3. Ertapenem	8
2.5. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması	10
2.5.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi	10
2.5.1.1. Dış Membran Porin Değişimleri	10
2.5.1.2. Aktif Pompa(Efluks) Sistemleri ile İlacın Dışarı Atılması	11
2.5.2. İlacın Hedef Bölgesi Olan PBP'lerde Meydana Gelen Değişiklikler	11
2.5.3. İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi: Beta-Laktamazlar	12
2.6. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları	13
2.6.1. İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşmaması	13
2.6.1.1. Porin Değişimleri	13
2.6.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi	13
2.6.2. Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı (Karbapenemazlar)	14
2.6.3. Hedef PBP Değişimleri	14
2.7. Beta-Laktamazların Tarihçesi	14

2.7.1. Ambler Sınıflandırması	16
2.7.2. Bush-Jacoby-Medeiros Sınıflandırması	17
2.7.2.1. Grup I Kromozomal Enzimler Amp C (Beta-Laktamazlar)	17
2.7.2.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta-laktamazlar	18
2.7.2.3. Grup 3 Beta-Laktamazlar (Metallo-Enzimler)	20
2.7.2.3.1. Metallo-Beta-Laktamazların Biyokimyası	21
2.7.2.3.2. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-Beta-Laktamazlar	22
2.7.2.3.3. Transfer Edilebilir Metallo-Beta-Laktamazlar	22
2.7.2.3.3.1. Metallo-Beta-Laktamazların Aktarılmasında Kullanılan Genetik Araçlar	22
2.7.2.3.3.1.1. IMP Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar	24
2.7.2.3.3.1.2. VIM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar	26
2.7.2.3.3.1.3. SPM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar	28
2.7.2.3.3.1.4. GIM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar	29
2.7.2.3.3.1.5. NDM-1 (New Delhi Metallo-Beta-Laktamazlar)	29
2.7.2.3.4. Metallo-Beta-Laktamazların Araştırılması	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>34</b>
3.1. Klinik Örneklerden izolasyon	34
3.1.1. Vitek 2 Otomatize Sistem	34
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Karbapenem Direnci	35
3.3. MBL Tespitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler	35
3.3.1. Modifiye Hodge Testi	35
3.3.2. Kombine Disk Difüzyon Testi	36
3.3.2.1. EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) Hazırlanışı	36
3.3.3. Çift Disk Sinerji Testi	37
<b>4. BULGULAR</b>	<b>38</b>
4.1. Karbapenem Dirençliliği	38
4.2. Çalışılan İzolatların Tür Dağılımı	39
4.3. Materyallerin Gönderildiği Kiniklere Göre Dağılımı	40
4.4. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı	41
4.5. Antibiyogram Sonuçları	45

4.6. Metallo-Beta-Laktamaz Enziminin Fenotipik Olarak Tanımlanması	47
4.6.1. Modifiye Hodge Testinin Sonuçları	47
4.6.2. Kombine Disk Difüzyon Testi	49
4.6.3. Çift Disk Sinerji Testi	51
4.6.4. Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Difüzyon Testi ve Çift Disk Sinerji Test Sonuçları ve Uyumları	54
<b>5. TARTIŞMA</b>	58
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	66
<b>KAYNAKLAR</b>	68
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	81

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Peptidoglikan Monomer Yapısı	5
Şekil 2.2.	Beta-Laktam antibiyotiklerin kimyasal yapıları	9
Şekil 2.3.	Karbapenem grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.4.	Beta-laktamazların üç boyutlu yapıları	12
Şekil 3.1.	0.5 Mc Farland bulanıklığı	35
Şekil 3.2.	Mueller Hinton agarda diskler arası 20' mm lik mesafe	37
Şekil 4.1.	Hastaların cinsiyet dağılımı	40
Şekil 4.2.	Klinik örneklerin dağılımı-2	42
Şekil 4.3.	Pozitif MHT örnek-1	47
Şekil 4.4.	Pozitif MHT örnek-2	47
Şekil 4.5.	KDD testi pozitif <i>K. pneumoniae</i> MBL-1	49
Şekil 4.6.	KDD testi ile pozitif <i>A baumannii</i> MBL-2	49
Şekil 4.7.	KDD testi ile pozitif <i>P.aeruginosa</i> MBL-3	50
Şekil 4.8.	İmipenem -EDTA Kombine disk difüzyon testi negatif suş	50
Şekil 4.9.	Çift Disk Sinerji testi pozitif MBL-1	52
Şekil 4.10.	ÇDS testi pozitif MBL-2	52
Şekil 4.11.	ÇDS testi negatif	52
Şekil 4.12.	Fenotipik testlerin pozitif sonuçları (Sayı/%)	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> İmipenem ve Meropenemin <i>Enterobacteriaceae</i> ve non-fermentatif GN bakteriler için MİK değeri	7
<b>Çizelge.2 2.</b> Beta-Laktam antibiyotiklere direnç	13
<b>Çizelge 2.3.</b> Beta-Laktamazların grupları ve genel özellikleri	19
<b>Çizelge 2.4.</b> İmipenemaz tipi Metallo-Beta-Laktamazların bulunduğu bakteriler ve bildirilen ülkeler	31
<b>Çizelge 2.5.</b> VIM, SPM, GIM tipi MBL enzimleri	32
<b>Çizelge 4.1.</b> Suşların karbapenemlere direnç oranları (sayı/%)	38
<b>Çizelge 4.2.</b> Çalışmaya alınan 261 suşun tür dağılımı (sayı/%)	39
<b>Çizelge 4.3.</b> Çalışmaya alınan 261 suşun <i>Enterobacteriaceae</i> ve non- <i>enterobacteriaceae</i> 'ye göre dağılımı	39
<b>Çizelge 4.4.</b> Suşların gönderildiği klinikler (sayı/%)	40
<b>Çizelge 4.5.</b> İzolatların klinik örneklere göre dağılımı (Sayı/%)	41
<b>Çizelge 4.6.</b> Klinik materyallere göre tür dağılımı (Sayı)	43
<b>Çizelge 4.7.</b> Suşların antibiyotiklere direnç oranları (Sayı/%)	45
<b>Çizelge 4.8.</b> Suşların antibiyotiklere hassasiyet oranları (Sayı/%)	46
<b>Çizelge 4.9.</b> Panellerde kullanılan antibiyotikler	46
<b>Çizelge 4.10.</b> MHT pozitif 199 suşun tür dağılımı (sayı/%)	47
<b>Çizelge 4.11.</b> MHT ile pozitif 199 suşun izole edildiği klinik materyaller (sayı/%)	48
<b>Çizelge 4.12.</b> MHT pozitif 199 suşun <i>Enterobacteriaceae</i> ve non- <i>enterobacteriaceae</i> 'ye göre dağılımı	48
<b>Çizelge 4.13.</b> KDD testi ile MBL pozitif 71 suşun dağılımı (sayı/%)	49
<b>Çizelge 4.14.</b> KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun <i>Enterobacteriaceae</i> ve non- <i>enterobacteriaceae</i> 'ye göre dağılımı	50
<b>Çizelge 4.15.</b> KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun izole edildiği klinik materyaller (Sayı/%)	50
<b>Çizelge 4.16.</b> KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun servislere göre dağılımı (sayı)	51
<b>Çizelge 4.17.</b> ÇDS testi ile MBL 37 pozitif suşun tür dağılımı (Sayı/%)	52
<b>Çizelge 4.18.</b> ÇDS testi ile MBL pozitif 37 suşun <i>Enterobacteriaceae</i> ve non- <i>enterobacteriaceae</i> 'ye göre dağılımı	53
<b>Çizelge 4.19.</b> ÇDS testi ile MBL pozitif 37 suşun klinik örneklere göre dağılımı (Sayı/%)	53
<b>Çizelge 4.20.</b> Çift Disk Sinerji testi ile MBL 37 pozitif suşun servislere göre dağılımı (Sayı)	54
<b>Çizelge 4.21.</b> MHT, KDD ve ÇDS Test Sonuçları	54
<b>Çizelge 4.22.</b> Fenotipik testlerin uyum oranı (%)	55
<b>Çizelge 4.23.</b> MHT, KDD ve ÇDS testi pozitif 9 suşun servislere, klinik materyale, dirençli olduğu karbapenem grubuna ve türe göre dağılımı	56
<b>Çizelge 4.24.</b> Fenotipik testlerin istatistik sonuçları	57

## SİMGELER VE KISALMALAR DİZİNİ

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>ÇDS</b>	: Çift Disk Sinerji Testi
<b>ÇİD</b>	: Çoklu İlaç Direnci
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>ERT</b>	: Ertapenem
<b>ESBL</b>	: Extend Spectrum Beta-Lactamase
<b>GİM</b>	: German İmipenemase Metallo-Beta-Laktamaz
<b>GN</b>	: Gram Negatif Bakteriler
<b>NFGN</b>	: Gram Negatif Non-Fermenter
<b>GSBL</b>	: Geniş Spekturumlu Beta-Laktamaz
<b>HE</b>	: Hastane Enfeksiyonu
<b>İMP</b>	: İmipenemaz Tipi
<b>KDD</b>	: Kombine Disk Difüzyon
<b>MBL</b>	: Metallo-Beta-Laktamaz
<b>MEM</b>	: Meropenem
<b>MIK</b>	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>MHT</b>	: Modifiye Hodge Test
<b>MPA</b>	: Merkapto Propronik Asit
<b>MYSTIC</b>	: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
<b>NAG</b>	: N-asetilglukozamin
<b>NAM</b>	: N-asetilmuramik asit
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NDM</b>	: New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz
<b>KDD</b>	: Kombine Disk Difüzyon Testi
<b>PBP</b>	: Penisilin Binding Protein
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SMA</b>	: Sodyum Merkaptoasetik asit
<b>VİM</b>	: Verona İntegron-Encoded Metallo-β-Lactamase
<b>YB</b>	: Yoğun Bakım Ünitesi

## ÖZET

### Karbapenemlere Direnç Gösteren Gram Negatif Bakterilerde Metallo-Beta-Laktamaz Enziminin Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Karbapenemler, çoklu ilaç dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Karbapenem direncinin en önemli mekanizmalarından biri Metallo-Beta-Laktamazların üretimidir. Metallo-Beta-Laktamaz genleri kromozomda ya da plazmidde bulunur ve bakteri kökenleri arasında kolayca yayılabilir.

Çalışmamızda, Balcalı Hastanesi kliniklerinden Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji birimine gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen ve karbapenemlere direnç gösteren Gram negatif bakterilerde, Metallo-Beta-Laktamaz enzimi üreten suşların fenotipik yöntemlerle oranını belirlemek, Metallo-Beta-Laktamaz tayininde bu fenotipik yöntemleri karşılaştırmak ve Metallo-Beta-Laktamaz üretiminde fenotipik yöntemleri kullanarak hangisinin rutin uygulamalarda daha yararlı olabileceği amaçlanmıştır.

Bu amaçla Haziran-Ekim 2012 ve Şubat-Mart 2014 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden Merkez Laboratuvarına gönderilen materyallerden karbapenem dirençli 261 Gram negatif bakteride fenotipik yöntemlerle Metallo-Beta-Laktamaz üretimi araştırıldı. Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik dirençleri Clinical and Laboratory Standards Institute önerileri doğrultusunda Vitek 2 otomatize sistem ile belirlendi. Metallo-beta-laktamaz üretimi Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Difüzyon ve Çift Disk Sinerji Testi ile araştırıldı. Karbapenem dirençli suşlar arasında, imipenem %90.4, meropenem %74.3, ertapenem %46.6 dirençli olarak bulunmuştur.

Karbapenem dirençli Gram negatif bakteri suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz üretimi modifiye Hodge testi ile %76.2, Kombine disk difüzyon ile %27.2, Çift disk sinerji yöntemi ile %14.2 olarak bulunmuştur. Kombine disk difüzyon ve modifiye Hodge testi ile en çok *A. baumannii*, Çift disk sinerji testi ile en çok *P. aeruginosa* suşlarında Metallo-beta-laktamaz üretimi saptandı. Metallo-beta-laktamaz araştırılmasında hızlı, basit, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan iyi bir fenotipik tarama yöntemine gerek vardır. Bu bulguların ışığı altında, fenotipik yöntemlerden hangisinin rutinde kullanılabilirliği konusunda, bu suşlardaki Metallo-beta-laktamaz üretiminin moleküler yöntemlerle saptanması gerçeğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahatar Sözcükler:** Karbapenem, Metallo-beta-laktamaz, Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Difüzyon Testi, Çift Disk Sinerji Testi.

## ABSTRACT

### Carbapenems-Resistance Gram Negative Bacteria of the Metallo-Beta-Lactamase Enzyme by Phenotypic Methods Investigation

Carbapenems are the most frequently used antibiotics in the treatment of multi-drug resistant Gram negative bacterial infections. One of the major important mechanisms of carbapenem resistance is production of metallo-beta-lactamases. Metallo-beta-lactamases genes reside on chromosome or plasmids and easily spread among bacterial strains.

Our study Balcalı Hospital Central Laboratory of Clinical sent to the Microbiology unit isolated from various samples and resistance to carbapenems in Gram-negative bacteria to determine the rate by phenotypic methods of producing strains metallo-beta-lactamases enzymes, to compare these phenotypic methods for the determination of metallo-beta-lactamases and using phenotypic methods in metallo-beta-lactamases production was intended to be which may be more useful in applications of the routine.

For this purpose, from June to October 2012 and February-March 2014 sent to the Central Laboratory of carbapenem of materials from various clinics in Gram-negative bacteria resistant to 261 metallo-beta-lactamases production was investigated by phenotypic methods. Identification of bacteria and antibiotic resistance of Clinical and Laboratory Standards Institute in accordance with the recommendations were determined by Vitek 2 automated system. The production of metallo-beta-lactamases was investigated with modified Hodge test, combined disk diffusion, and double-disk synergy test. Among carbapenem resistant strains imipenem 90.4%, meropenem 74.3%, and ertapenem 46.6% were found to be resistant.

Carbapenem resistant Gram-negative bacteria strains metallo-beta-lactamases production by modified Hodge test 76.2%, combined disk diffusion 27.2%, and with double-disk synergy test was 14.2%, respectively. The most production of metallo-beta-lactamases strains with modified Hodge test and combined disk diffusion test was *A. baumannii*, the most production of metallo-beta-lactamases strains with double-disk synergy test was *P.aeruginosa* as an detected.

Metallo-Beta-Lactamase to study fast, simple, sensitivity and specificity is high, there is a need for a good phenotypic screening method. In light of these findings, phenotypic method can be used in which of the routines in the topic, this determination of molecular methods of production of the fact that the strains that produce metallo-beta-lactamases revealed.

**Keywords:** Carbapenem, Metallo-beta-lactamases, Modified Hodge Test, Combined Disc Test, Double Disc Sinergy Test.

# 1. GİRİŞ

*P.aeruginosa* ve *A. baumannii*, *K. pneumoniae* gibi bakteriler son yıllarda immün sistemi baskılanmış ve özellikle hastanede yatan hastalarda artan oranlarda görülen fırsatçı enfeksiyonlara neden olan GN bakteriler olarak bilinmektedir<sup>1,3</sup>. Özellikle yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösterebilen bu bakterilerin yol açtığı ciddi enfeksiyonlarda karbapenemler, geniş antibakteriyel spektrumları, bakteri membranlarından hızla geçebilmeleri, AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle ilk tercih edilen antibiyotik grubudur<sup>12,37</sup>. Karbapenemlerin klinik kullanıma girmesi çoklu ilaç dirençli bakterilerin neden olduğu ciddi HE’de önemli bir avantaj sağlamış, ancak özellikle ampirik tedavide yaygın kullanılmaları nedeniyle *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi non-fermentatif basillerde karbapenem direnci ile de sıklıkla karşılaşılır hale gelmiştir<sup>4,25</sup>. Metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimine bağlı karbapenem direnci özellikle *P.aeruginosa* ve *A. baumannii* kökenlerine bağlı HE’de önemli bir sorun olarak kabul edilmekte, farklı coğrafik bölgelerden farklı direnç oranları bildirilmektedir<sup>18</sup>. MBL üreten bakteriler aztreonam hariç tüm beta-laktamlara yüksek düzeyde dirençlidir. *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae*’de saptanmış 5 enzim tipinden oluşurlar. Kazanılan MBL’ler moleküler yapılarına göre; IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM olarak adlandırılırlar ve son yıllarda sayıları artarak dünya çapında yayılma göstermişlerdir. Metallo-beta-laktamazları kodlayan genler kromozom veya plazmid aracılı olabilir ve sınıf I integronlar üzerinde yer alır. MBL’ler penisilin, sefalosporin gibi diğer beta-laktam antibiyotikleri de hidrolize edebilmektedirler. Metallo enzimler ise farklı olarak çinko iyonu kullanırlar, katalitik aktiviteleri için çinkoya gereksinim duyarlar, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve tiol temelli bileşiklerle inhibe edilirler. Bu enzim genini taşıyan bakteriler hastane içinde fark edilmeden yayılarak, HE’ye neden olurlar ve diğer patojen mikroorganizmalara MBL genini transfer edebilirler. Bu nedenle karbapenem duyarlı MBL taşıyan mikroorganizmaların laboratuvarlarda saptanması klinik açıdan son derece önemlidir. Son zamanlarda ülkemizde de MBL üreten GN mikroorganizmalara rastlanması çeşitli araştırmaların yapılmasını gerektirmiştir. MBL taşıyan bakteriler standart duyarlılık yöntemleriyle karbapenemlere duyarlı saptanabilmektedirler<sup>18,29,105</sup>.

MBL enzimlerinin varlığının araştırılması için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dokümanlarında önerilen standart bir yöntem henüz bildirilmemektedir. Duyarlılık testleri ise MBL üretimini göstermek için yetersiz kalmaktadır. Bu enzimlerin tespit edilmesinde sorumlu genlerin moleküler tekniklerle aranması veya birtakım enzim testlerinin yapılması gerektiği önerilmektedir. Ancak bunların rutin uygulamalarda kullanılması pratik olmadığından enzim varlığını göstermeye dayanan birtakım fenotipik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında en sık kullanılanlar kombine disk difüzyon testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testi ve E testtir.

Bu çalışmanın amacı, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi kliniklerinden Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji birimine gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen karbapeneme direnç gösteren Gram negatif bakterilerde (*Enterobacteriaceae* türleri ve non-fermantatif bakteriler) MBL enzimi üreten suşların fenotipik yöntemlerle oranını belirlemek, MBL tayininde bu fenotipik yöntemleri karşılaştırmak ve MBL üretiminde fenotipik yöntemleri kullanarak hangisinin rutin uygulamalarda daha yararlı olabileceği amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonu (nozokomiyal enfeksiyon) herhangi bir enfeksiyon hastalığı kuluçka döneminde olmayan ve enfeksiyonu bulunmayan hastada, hastaneye yatışından itibaren 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan 10 gün sonrasına kadar geçen süre içerisinde enfeksiyon oluşması anlamına gelmektedir<sup>1,2,3</sup>. Hastaneye yatan hastaların %10 kadarında HE geliştiği belirlenmiştir. Ayrıca bazı HE sonucu kaybedilen hastaların oranı da küçümsenemeyecek düzeydedir<sup>4</sup>. HE'de en sık görülen mikroorganizmalar *E.coli* başta olmak üzere GN barsak bakterileri ve *S. aureus*'dur<sup>4,5</sup>. En sık görülen HE'leri idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, pnömoniler ve bakteriyemi'lerdir<sup>6</sup>. Hastane genelinde HE insidansı % 5-10 iken YBÜ'nde bu oran % 20-25 olarak bildirilmektedir<sup>7</sup>. NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System)'nin verilerine göre 1980-1982 yılları arasında nozokomiyal bakteriyemili olguların % 42'sini GN bakteriler oluştururken, 1990-1992 yılları arasında %20'sini oluşturmuştur<sup>8</sup>. Ülkemizde değişik hastanelerden bildirilen HE'leri insidansı %3-7.8 arasındadır<sup>9</sup>. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon hastalıklarının yüksek oranda görülmesi, bilinçsiz ve amaç dışı antibiyotik kullanımı, ulusal antibiyotik politikalarının yetersizliği, kalabalık ve yetersiz hastane hijyen şartları gibi sosyo-ekonomik faktörler ve davranış bozuklukları sonucudur. Bu enfeksiyonlar antimikrobiyal direncin artmasına katkıda bulunurken, büyük ekonomik kayıplara da neden olmaktadır<sup>10</sup>.

### 2.2. Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotik Direnci

Bir ilaca karşı "bakteri direnci", özgül bir bakterinin, üreme fonksiyonlarını bozan ya da ölümüne neden olan bir ilaca karşı koyma yeteneği olarak tanımlanmaktadır<sup>11</sup>. Antibiyotik tüketiminin devam etmesiyle birlikte yeni dirençler ortaya çıkmaya başlamış ve direnç genlerinin epidemik transferi sonucu dirençli kökenlerin hastalar arasında epidemik yayılımı meydana gelmiştir<sup>12</sup>. Bulundurdukları dirençle ilişkili moleküler mekanizmaların, *Enterobacteriaceae* kökenlerine aktarılabilir nitelikte olması dirençli *E. coli*, *S. typhii*, *S. sonne*, *K. pneumoniae* ve *E. cloacae* kökenlerinin ortaya çıkışı ile sonuçlanmıştır<sup>13</sup>. GN bakteriler son yıllarda immün sistemi

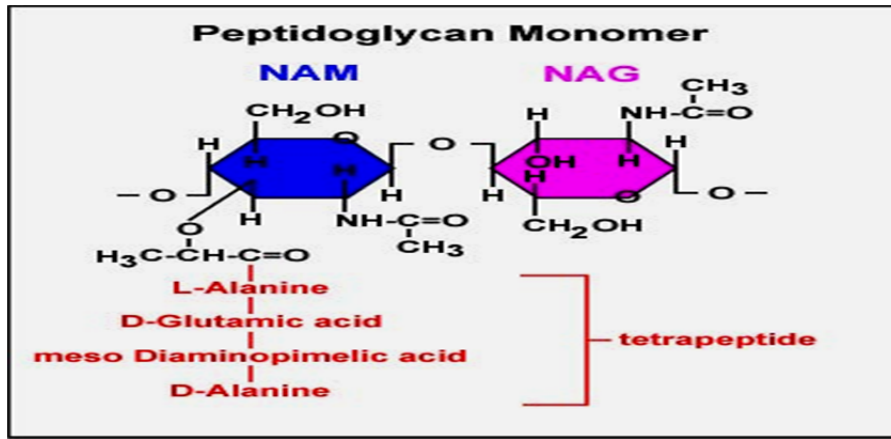
baskılanmış ve ilaç tedavisi alan hasta gruplarında artan oranlarda görülen önemli fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösteren GN bakterilerin yol açtığı ciddi enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır<sup>14</sup>.

Günümüzde antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve immun sistemi bozulmuş hasta sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Ülkemizde hastanelerde en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Koagulaz Negatif Staphylococlar* (KNS), *Enterobacter spp*, *Enterococ*'lar, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp*. dir<sup>15,16</sup>.

### **2.3. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler**

Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur. Bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler<sup>17</sup>. Bu gruptaki antimikrobialerin ortak özellikleri yapılarında beta laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır. Her grup beta laktamın özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlarda beta laktam halkasına bağlanan başka halka bulunmamaktadır<sup>18</sup>. Beta laktamlar bakteri hücre duvarının major polimeri olan peptidoglikan sentezini inhibe ederek etki ederler. Peptidoglikan tabakası ard arda dizilmiş N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) diye bilinen iki amino şekerin yer aldığı zincirlerden oluşmaktadır. Her zincirde ayrıca NAM'e bağlı, 4 amino asitten oluşan peptid zinciri bulunur. Bu yapı NAM üniteleri arasında çapraz peptid bağları oluşturularak sağlanır<sup>19</sup>. Bu tabaka çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu çapraz bağlantı N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler "PBP" adı verilir. Beta-laktam antibiyotiklerin temel hedefi işte bu penisilin bağlayıcı proteinlerdir. Bu benzerlik beta-laktam antibiyotiklerin PBP ile reaksiyona girmelerini ve D-alanin D-alanin molekülünün yerini alarak transpeptidasyonu engellemelerini sağlar<sup>17</sup>. Beta-laktamlar D-alanyl-D-alanine transpeptidase aktivitesini, stabil esterler oluşturacak şekilde inhibe

etmektedir<sup>20</sup>. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir<sup>21</sup>. Beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için GN bakterilerde porin (Outer Membran Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir. Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mürein) tabaka, bakteri hücre duvarının asıl polimeridir ve hücre duvarına şeklini vererek ozmotik güçlere karşı korur ve mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar<sup>18</sup>. Beta-laktam grubunda penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler yer almaktadır.



Şekil 2.1. Peptidoglikan monomer yapısı

#### 2.4. Karbapenemler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında “*Streptomyces cattleya*” tarafından üretilen ve “thienamycin” adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. İlk bulunan ajan imipenemdir. Meropenem ve imipenem; tienamisinin sentetik türevleridir. Beta laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan biyosentezi üzerine etki göstermektedir. İmipenem; PBP1, PBP2, PBP4, PBP5 ve PBP6 ya bağlanabilmekte bunlardan PBP2 ye diğerlerinden daha güçlü bağlanmaktadır<sup>22</sup>. Yapısındaki stabilite sayesinde de karbapenemler GN bakterilere karşı yüksek etkinlik göstermektedir<sup>23</sup>.

İmipenem; Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar, nadir non-fermentatifler ve *Aeromonas* dışında Gram pozitif (GP), GN ve anaerop mikroorganizmalarla oluşan HE ve toplumdaki kazanılmış enfeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir<sup>22</sup>.

1996 yılından sonra ise karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmiştir. GP, GN ve anaerop bakterilere karşı etkindir<sup>22</sup>. 2001 yılında ise “Food and Drug Administration” (FDA) tarafından ertapenem’e karbapenem grubu üçüncü antibiyotik olarak onay vermiştir. Geniş etki spektrumları ve dirençli bakterilerle oluşan ciddi enfeksiyonlarda tercih edilmeleri nedeniyle karbapenem grubu antibiyotikler önemli antibakteriyel ajanlar içerisinde yer almaktadır.

Karbapenemlerin etki spektrumları; ciddi enfeksiyon etkeni olan *Enterobacteriaceae*, anaeroplara, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*’yi kapsamaktadır ve bu enfeksiyonların tedavisinde önemli sorun olan, GSBL ve kromozomal AmpC tipi beta-laktamaz enzimlerine dirençlidirler. Ancak sınıf B metallo-beta-laktamazlar dahil karbapenemazlar bu antibiyotikleri hidroliz edebilmektedir. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır enfeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça önemlidir. Yirmi yılı aşkın süredir klinik kullanımda olan bu grubun üyelerinden, imipenem, meropenem ve ertapenem ülkemizde kullanımdadır<sup>22,24</sup>. Diğer yeni karbapenemler ise biapenem, faropenem ve panipenemdir<sup>25</sup>.

#### 2.4.1. İmipenem

Bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olan imipenemin GP, GN, aerob ve anaerob mikroorganizmaları içine alan çok geniş bir etkinlik kapsamı vardır. Bu mikroorganizmaların çoğu için MİK 4mg/L’nin altındadır. *Enterobacteriaceae* ve NFGN bakteriler için sınır MİK değerleri çizelge 1’de görülmektedir<sup>26</sup>.

Antibakteriyel Aktivite; İmipenem Lancefield sınıflamasına göre A,B,C,G grubunda yer alan Streptokoklara karşı mükemmel etkinlik gösterir. Beta laktamaz üretmeyen penisiline dirençli Enterokok suşları ve *E. faecium* imipeneme dirençlidir. İmipenem *Enterobacteriaceae*’lere, *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*’ye düşük konsantrasyonlarda etkilidir. *B. fragilis* dahil birçok anaerobik bakteriye etkilidir<sup>22</sup>.

Etki Mekanizması; Diğer beta-laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek etki eder ve bakterisidaldir. İmipenem GP ve GN bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerine yüksek bir afinite ile bağlanır. Bağlanma ilk önce PBP2'ye ve arkasından da PBP1a'ya olur<sup>22</sup>. *E.Coli*'de PBP1a, 1b, 2, 4, 5 ve 6'ya; *P.aeruginosa*'da PBP1a, 1b, 2, 4, 5'e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder<sup>27,28</sup>. GN bakterilerde dış membrana penetrasyonu daha fazladır<sup>29</sup>. Düşük molekül ağırlığı ve zwitteryonik (nötral yük) nedeniyle bakterinin hücre duvarına, penisilin ve sefalosporinlerden daha hızlı penetre olur<sup>30</sup>. Birçok bakteri tarafından salgılanan kromozomal veya plazmidle taşınan beta laktamaz, penisilinaz, sefalosporinaz ile hidrolize olmaz. Karbapenemler penisilin ve sefalosporinlerin aksine, aminoglikozid ve kinolonlar gibi GN mikroorganizmalara karşı postantibiyotik etkiye sahiptirler<sup>22</sup>.

Direnç; *S. maltophilia* karbapenemlere doğal dirençlidir, çünkü karbapenemleri inaktive eden enzimler üretirler. Benzer enzimler *B.cepacia*'da da vardır. Bununla beraber direnç temel olarak D2 olarak bildirilen dış membran proteinin kaybı ile olmaktadır<sup>22</sup>.

Farmakokinetik ve Farmakodinamik özellik; İmipenemin plazma yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir. Yaklaşık 10 saat içinde verilen dozun %70'i idrarla atılır<sup>22,31</sup>.

Yan Etkileri; İmipenem genellikle iyi tolere edilir. Ciddi yan etkisi yoktur. Bu etkin maddeyi içeren ilaçlar: İmipenem + silastatin sodyum, Cilapem, Silanem, Tienam IV<sup>22</sup>.

**Çizelge 2.1.** İmipenem ve Meropenemin *Enterobacteriaceae* ve NFGN bakteriler için MİK değerleri

<u>MİK(µg/ml)</u>	<u>Sonuç</u>
≤4	<b>Duyarlı</b>
8	Orta Duyarlı
≥16	<b>Dirençli</b>

### 2.4.2. Meropenem

Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez. Meropenem GN mikroorganizmalara karşı imipenemden daha etkilidir.

Etki Mekanizması; aktivitesinden, bakteri içine mükemmel penetrasyonu, penisilin bağlayan proteinlere karşı yüksek affinitesi ve beta laktamazlara stabilitesi sorumludur<sup>32</sup>.

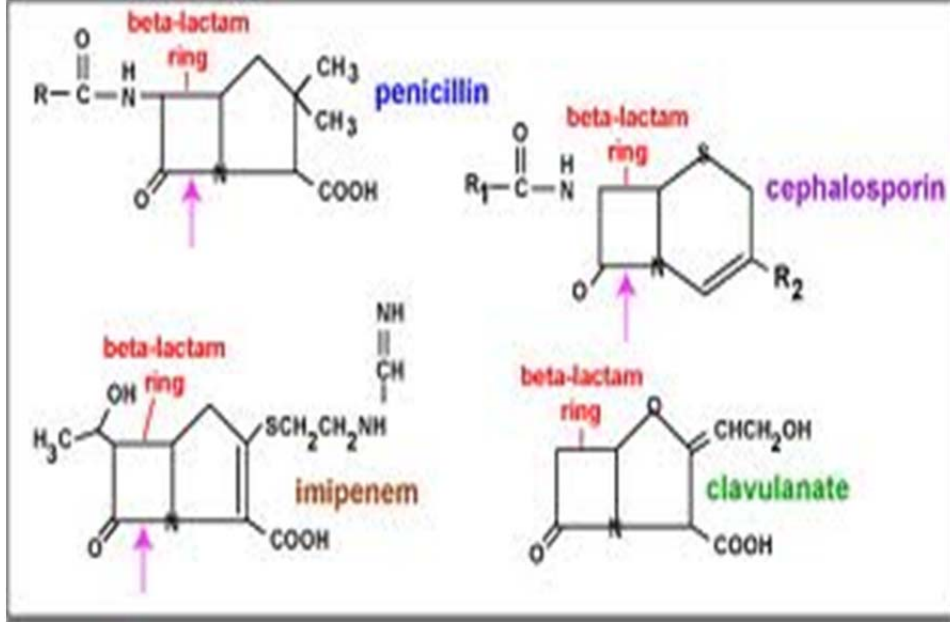
Direnç; İmipenem gibi meropenem de *S.maltophilia*'da bulunan çinko bağımlı beta laktamazlarla hidrolize olur. *E. faecium*'un hücre duvarında bulunan PBP5 ve PBP6'ya bağlanamaz. Meropenem GN mikroorganizmaların D2 porinlerinden imipenemden daha hızlı geçtiği için permeabilite yoluyla gelişen direnç nadirdir<sup>32</sup>. Bu etkin maddeyi içeren ilaçlar: Meronem, Merosid, Merozan, Mopem.

### 2.4.3. Ertapenem

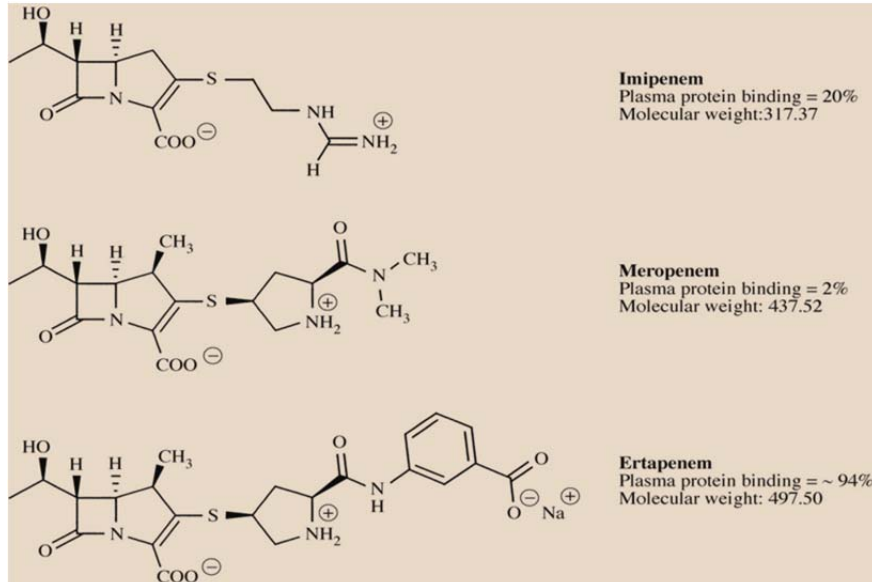
Karbepenemler, kullanımda olan antibiyotikler arasında bilinen en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahip antibiyotiklerdendir. Antimikrobiyel aktivite ve kullanım alanlarına göre üç gruba ayrılmaktadır. Grup 1 içinde yer alan ertapenem diğerlerinden farklı olarak NFGN etkileri sınırlı olup toplum kökenli enfeksiyonlarda da kullanılabilir. Hastaneye yatması gerekmeyen hastalarda ayaktan parenteral antibiyotik tedavi uygulamasında iyi bir alternatif olabilir<sup>33</sup>. Klinik kullanım için ABD'de 2001, Avrupa'da 2002 ve Türkiye'de 2008 yılında onay almıştır. Ertapenem, Türkiye'de erişkin hastalarda duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu orta ve şiddetli enfeksiyonların tedavisinde, ayrıca etken mikroorganizma bilinene kadar komplike intra-abdominal enfeksiyon, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit dışı diyabetik ayak enfeksiyonları, komplike idrar yolları enfeksiyonları, akut pelvik enfeksiyonlar ve toplum kökenli pnömonilerin ampirik tedavisinde endikasyon almıştır<sup>33,34</sup>.

Ertapenemin GN ve GP bakteriler ile anaeroplara dahil geniş bir etki spektrumu bulunmaktadır. Ancak anyonik karakteri, lipofilik ve yüksek molekül ağırlığı özelliğinden dolayı bakterinin OprD porininden girmez. Bundan dolayı hem *Pseudomonas*'lara hem de *Acinetobacter* gibi NFGN etkinliği yoktur veya düşüktür. Bakterinin hedef moleküldeki değişiklikler ertapenem direncinde önemli rol oynar.

Ertapenem metallo- $\beta$ -laktamaz ve bazı diğer karbapenemazlar hariç GSBL ve amp C tipi  $\beta$ -laktamaz üreten GN bakterilere oldukça etkili bulunmuştur<sup>35,36</sup>.



Şekil 2.2. Beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı



Şekil 2.3. Karbapenem grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı

## 2.5. Beta- Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması

Beta-laktam ajanlar hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara PBP bağlanarak etki ederler<sup>37,38</sup>. Bir beta-laktam ajanın etki gösterebilmesi için, eğer varsa dış zardan ve periplazmik aralıktan geçmesi, hücre zarındaki PBP'lere etkin konsantrasyonda ulaşması ve bu enzimlere bağlanması gereklidir<sup>39</sup>. Dirençli bakteriler bu basamakların her birinde beta-laktam ajanlar için bir engel oluşturabilirler. Örneğin GN bakteriler porin kanallarını kapatarak geçişi zorlaştırabilir ve/veya periplazmik aralıktaki beta-laktamazlar beta-laktam antibiyotiği parçalayabilir. Bazı bakteriler beta-laktamların iyi bağlanamadığı yeni veya değişmiş PBP'ler eksprese edebilir, *P. aeruginosa* gibi bazı bakteriler ise aktif pompa sistemleri ile beta-laktamları hedefine ulaşmadan atabilirler<sup>40,41,42,43</sup>.

Beta-laktam ajanlara direnç 3 genel mekanizma ile ortaya çıkmaktadır<sup>43,44</sup>.

1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi,
  - 1.a. Dış membran Porin Değişimleri
  - 1.b. Aktif Pompa (Efluks) Sistemleri ile İlacın Dışarı Atılması
2. Hedef PBP moleküllerinin değişmesi,
3. İlacı inaktive eden beta-laktamazların üretimi.

Bu mekanizmalardan bir ve üçüncüsü GN bakterilerde, ikincisi ise GP bakterilerde daha sık görülmektedir. Genel olarak, antibiyotiklere direnç birbiri ile uyumlu çalışan bir dizi mekanizma aracılığıyla gelişmektedir. Beta-laktam antibiyotiklere direnç de sıklıkla yukarıda sayılan mekanizmaların birkaçının ortak etkilerinin bir sonucudur<sup>45</sup>.

### 2.5.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi

Bu durum, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilir<sup>46</sup>.

#### 2.5.1.1. Dış Membran Porin Değişimleri

Antibiyotiklerin etki gösterebilmesi için öncelikle hedeflerine ulaşması gereklidir. Örneğin beta-laktam ajanlar PBP'lere bağlanabilmek için sitoplazmik zarın

dış yüzüne ulaşmalıdır. Peptidoglikan tabaka, geniş aralıkları nedeniyle antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girişine engel oluşturmaz. Ancak, GN bakterilerin dış zarı, antibiyotikler ve ortamdan alınacak diğer moleküller için yarı geçirgen bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle dış zar yapısı tüm GN bakterilere GP'lerden farklı bir avantaj verir. Küçük hidrofilik moleküller dış zardan ancak içi su dolu kanalcıklar olan porinler aracılığı ile geçebilir<sup>46</sup>. Bu nedenle porin proteinlerindeki yapıyı veya iyonik yükü değiştirebilecek değişiklikler veya özel porinlerin kaybı esas olarak hidrofilik moleküllerin girişini engellemektedir. Beta-laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler içerdikleri için porin proteinlerdeki değişimlerden etkilenmektedir<sup>47</sup>. Örneğin, *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı sonucunda bu antibiyotik sınıfına karşı direnç gelişmekte, *E. coli* suşlarında dış membran porinlerinden OmpF ve OmpC'nin kaybı sonucunda beta-laktam MİK'da 8-16 kat artış görülmektedir<sup>47,48</sup>. Sefoksitine dirençli *E. coli* suşlarının çoğunda, bu direncin OmpF kaybı ile AmpC tipi enzimlerin aşırı üretiminin sinerjik etkilerinden kaynaklandığı belirlenmiştir<sup>49</sup>. *K. pneumoniae* suşlarında, moleküler sınıf A beta-laktamazların varlığı, bir dış membran porini olan OmpK 35'in kaybı ile birlikte gitmektedir<sup>50</sup>.

#### **2.5.1.2. Aktif Pompa (Efluks) Sistemleri ile İlacın Dışarı Atılması**

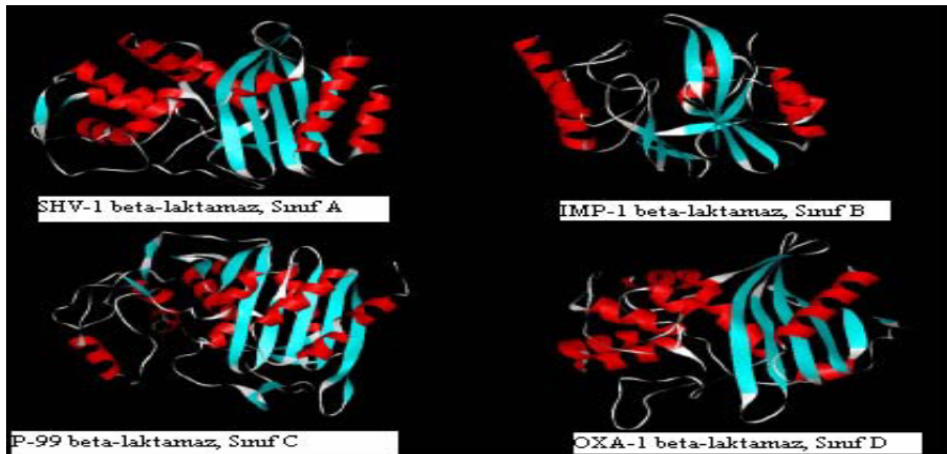
Bu mekanizma, beta laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmaları aktif dışa pompalama sistemleridir ve en iyi *P. aeruginosa*'da gösterilmiştir. Aktif dışa pompalama sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır<sup>51</sup>.

#### **2.5.2. İlacın Hedef Bölgesi Olan PBP'lerde Meydana Gelen Değişiklikler**

Hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta-laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir diğer mekanizmadır. Bu direnç kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar<sup>38,39,40</sup>. Bakterilerde iki grup PBP belirlenmiştir. Birincisi, düşük molekül ağırlıklı PBP (DD-karboksipeptidazlar), ikincisi de yüksek molekül ağırlıklı PBP'dir (transpeptidaz ve transglikozidoslar). Yüksek molekül ağırlıklı PBP'deki değişikliğe bağlı oluşan penisilin direnci GP'de GN'den daha fazladır<sup>52</sup>.

### 2.5.3. İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi: Beta-Laktamazlar

Beta-laktamazlar, beta laktam antibiyotiklerin beta laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurarak siklik halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir<sup>53</sup>. Beta laktam antibiyotiklerin ortak özellikleri beta laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır. Bu halkaya bağlanan farklı halka ve yan zincirlerle farklı özelliklere sahip değişik grup beta laktam antibiyotikleri elde edilir<sup>54</sup>. Beta laktam antibiyotiklere direnç esas olarak beta-laktamaz üretimine bağlıdır. Beta laktamazları kodlayan genler, bakteri kromozomlarında, plazmidlerde veya transpozonlarda yerleşmiş olabilirler. Son yıllarda pek çok bla geni (beta-laktamaz geni) integronlar üzerinde tanımlanmışlardır<sup>54</sup>. Beta-laktamazlar aktif bölgelerinde ya bir serin kökü (Ambler sınıf A, C, D) veya bir metal iyonu ( $Zn^{+2}$ ) (Ambler sınıf B) taşırlar ki bunlar beta laktam halkasındaki amid bağına bağlanıp hidrolize olmasını sağlar. Beta-laktamazların üç boyutlu yapıları Şekil 4'de belirtilmiştir<sup>55</sup>. Beta laktam antibiyotiklere karşı klinikte en çok gözlenen direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar; GP, GN ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir<sup>56</sup>. GN bakteriler daha çok sayıda beta-laktamaz üretirler. Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere GN bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir<sup>57</sup>.



Şekil 2.4. Beta-laktamazların üç boyutlu yapıları

**Çizelge 2.2.** Beta-Laktam antibiyotiklere direnç

Beta-laktam sınıfı	Direnç problemi
Penisilinler	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> * Penisiline duyarlılığı azalmış <i>S. pneumoniae</i> Ampisiline dirençli <i>H. influenzae</i>
Beta-laktamaz inhibitörleri	Enterobacteriaceae üyelerinin kromozomal AmpC tipi beta-laktamazların aşırı üretimi Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar İnhibitörlere dirençli TEM enzimleri (IRT) TEM-1 aşırı üretimi
Sefalosporinler	Kromozomal AmpC tipi beta-laktamazları aşırı üreten Enterobacteriaceae ve <i>P. aeruginosa</i> GSBL üreten Enterobacteriaceae üyeleri Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar
Monobaktamlar	Kromozomal veya plazmid kökenli AmpC tipi enzim üreten türler GSBL yapan Enterobacteriaceae üyeleri
Karbapenemler	Metallo-beta-laktamaz (IMP ve VIM-tipi) OXA-tipi karbapenem hidrolize eden beta-laktamaz üreten nonfermentatif basiller

\* Tüm beta-laktamlara dirençlidir

## 2.6. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Karbapenemlere karşı bilinen 3 etki mekanizması ile direnç gelişebilmektedir:

### 2.6.1. İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşamaması:

#### 2.6.1.1. Porin Değişimleri

Bu, özellikle *P.aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişmektedir<sup>37</sup>.

#### 2.6.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi

Aktif pompa (effluks) mekanizmaları *P.aeruginosa*'da tipiktir. Bu regülatör genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasını ve antimikrobiyal maddelerin dışarı atılmasına neden olur<sup>65</sup>. Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direnç gelişimine neden olur<sup>51,58</sup>.

### 2.6.2. Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı (Karbapenemazlar)

En geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından imipenem veya meropenemden birini, belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil, diğer beta-laktam ajanlara da etkilidirler<sup>22,59</sup>.

- a) **Ekstrinsik (Kazanılmış) Karbapenemazlar:** Ambler moleküler sınıflamasına göre A, B veya D moleküler sınıflarına ait olabilirler. Bunlar; imipenem, meropenem, penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama direnç gelişmesine neden olan ve tazobaktam başta olmak üzere beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimlerdir. *Acinetobacter spp.*, *P.aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'de bulunur. Sınıf D tipleri sadece *Acinetobacter spp.*'de, sınıf A tipleri ise birkaç *Enterobacteriaceae* izolatında bulunurlar<sup>60</sup>.
- b) **İntrinsik (Kromozomal) Karbapenemazlar:** Moleküler sınıf B'de yer alan bu enzimler aktif bölgelerinde çinko iyonları bulundurduklarından beta-laktamazlar içinde kendine ait özgün özelliğe sahiptir. Katalitik aktivite çinko iyonuna bağlıdır ve EDTA ile birleştiğinde kaybolur. Diğer moleküler sınıflara (A, C ve D) ait beta-laktamazlar çinko içermezler, serin bazlı mekanizmaları vardır ve birkaç istisna dışında önemli kromozomal karbapenemaz etkinlikleri yoktur. Bu grupta, *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 sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan metallo beta laktamazlardır<sup>14</sup>.

### 2.6.3. Hedef PBP Değişimleri:

Tek başına nadir görülür, ancak diğer mekanizmalar ile birlikte.

### 2.7. Beta Laktamazların Tarihçesi

Beta-laktamaz enzimi ilk kez 1928 yılında Fleming tarafından fark edilmiştir. Bu araştırmacı bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığını gözlemlemiş, 1940'da Abraham ve Chain, *E. coli*'den izole ettikleri ekstraktın penisilin etkisini

ortadan kaldırdığını göstermişler ve elde ettikleri bu enzime ‘penisilinaz’ adını vermişlerdir. 1960’ların sonlarında ampisilin ve diğer aminopenisilinlere karşı *E. coli*’nin direnç geliştirmesi HE da büyük bir problem olmaya başlamıştır<sup>61</sup>. Bu direnç çok çabuk bir şekilde *E. coli* suşlarına yayılmış ve *E. coli*’de bu dirence neden olan  $\beta$ -laktamaza TEM adı verilmiştir. GN basillerde ortaya çıkan  $\beta$ -laktamazlar 25 yıl boyunca birkaç çeşit ile sınırlı kalırken, 1978’den sonra pek çok yeni  $\beta$ -laktam antibiyotiğin (sefamisinler, karbapenemler, sulfonlar ve monobaktamlar) kullanıma girmesi ve tanımlama yöntemlerindeki gelişme ile birlikte  $\beta$ -laktamazların sayı ve çeşidinde hızlı bir artış gözlenmiştir<sup>40</sup>.

Beta laktamazlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılırlar. Beta laktamazların sınıflandırılmasında kullanılan en önemli parametrelerden biri substrat profili olup enzimin çeşitli beta laktam antimikrobisidler hidroliz etme aktivitesini gösterir. Bazı beta laktam anti-mikrobisidler bu kıyaslamada referans olarak seçilmiştir. Kıyaslamada inhibisyon profili bir diğer önemli parametredir. Beta laktamazların inhibitör etkilerini görmek için klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam kullanılır. Kloksasilin ve aztreonam zayıf inhibitörlerdir<sup>62</sup>.

Beta laktamazların molekül ağırlıkları, izoelektrik ve moleküler yapıları fiziksel karakterlerini belirler. Bu fiziksel özellikler sınıflandırılmalarında kullanılır<sup>63</sup>.

$\beta$ -laktamazlar çeşitli şekillerde isimlendirilmişlerdir:

- Etkiledikleri substratlara göre: CARB (karbenisilin), IMP (imipenem), OXA (oksasilin)
- Biyokimyasal özelliklerine göre: SHV (sülfidril hiper variabl) (SHV enzimi: aktif bölgede serin vardır).
- İlk izole edildikleri bakterilere göre: AER (*Aeromonas*), PSE (*Pseudomonas*)
- İlk izole edildikleri suşlara göre: P99
- İlk izole edildikleri hasta isimlerine göre: TEM (Temioniera), BIL (Bilal)
- İlk izole edildikleri eyaletlere göre: OHIO
- İlk izole edildikleri hastaneye göre: MIR ( Miriau Hospital in Providence), DHA (Dhahran Hospital in Saudi Arabia)

Günümüze kadar yaklaşık 400 civarında beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. Beta laktamazların çok çeşitli olmaları ve sayılarının gittikçe artması nedeniyle, hidrolitik etki spektrumlarına, inhibitörlere karşı duyarlılıklarına, aminoasit ve nükleotid dizilimine, kromozom veya plazmid aracılı olarak kodlanmalarına, biyokimyasal özelliklerine, izoelektrik noktalarına göre sınıflandırılmışlardır<sup>64</sup>.

### 2.7.1. Ambler Sınıflandırması

1980'de Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır. Ambler tarafından yapılan sınıflandırma amino asit ve nükleotid dizilerine dayanılarak yapılmıştır. Beta laktamazlar A,B,C,D olmak üzere dört grupta incelenmiştir. Her dört sınıfında kromozomal ve plazmid kökenli temsilcileri vardır. Klinik olarak en önemli beta laktamazlar sınıf A ve sınıf C'ye aittir<sup>65</sup>.

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

Sınıf B: Sınıf B beta-laktamazlar; aktif bölgelerinde Zn<sup>+</sup> bağımlı bir tiol grubu bulunan metallo-enzimlerdir. Bunların çoğu karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Aminoasit sekans analizleri temelinde B sınıf enzimler üç alt gruba ayrılmaktadır<sup>66</sup>. B1 ve B2 alt gruplar sekans homolojileri bakımından benzerdir, fakat B3 alt grubunun protein yapısı bu iki gruba benzemekle beraber sekans homolojileri benzer değildir. Diğer yandan B1 ve B3 grubu enzimler geniş etki spektrumuna sahip iken B2 grubu enzimler zayıf etki spektrumuna sahiptir<sup>67</sup>. Bazı *P. aeruginosa*, *A.baumannii*, *K.pneumoniae* ve *S.marcescens* klinik izolatlarında bulunabilen IMP tipi enzimler ve yine *P. aeruginosa* suşlarında görülebilen VIM tipi enzimler yer almaktadır<sup>68</sup>.

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<sup>63</sup>.

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios tarafından biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta-

laktamazları 4 gruba ayırdıkları sınıflandırmadır<sup>69</sup>. Bu grupların genel özellikleri çizelge 3'de görülmektedir<sup>70</sup>.

### **2.7.2. Bush-Jacoby-Medeiros Sınıflandırması**

1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından geliştirilmiş olan ikinci sınıflandırma ise substrat profilleri ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikleri esas kriter alınarak yapılan sınıflandırmadır. Bugün için en geçerli sınıflandırma olarak kabul edilmektedir. Sınıflandırma dört grupta yapılmıştır. Substrat özgülüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel alındığı fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri sınıflandırmış ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarın antibiyogram ile ilişki kurulabilmesini sağlamıştır<sup>69</sup>.

#### **2.7.2.1. Grup 1 Kromozomal Enzimler (Amp C Beta-Laktamazlar)**

Kromozomal beta-laktamazlar GN basillerin birçoğunda yaygın olarak bulunmaktadır, ancak bunların miktarı, sentez yolu ve dirençteki rolleri farklıdır<sup>71,72</sup>. Enterik bakterilerin büyük çoğunluğunda bulunan kromozomal enzimler Ambler grup C'dedir ve Amp C olarak da tanımlanmaktadır. Bu enzimler aktif bölgelerinin özellikleri nedeniyle 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler<sup>73</sup>. Karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına rağmen, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir. Bu nedenle de bu beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler<sup>74</sup>.

Grup I beta-laktamazlar indüklenebilir özelliktedir. Bu tip beta-laktamazları üreten türlerde esas sorun, indüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda beta-laktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır<sup>75</sup>. Normalde bakteriler tarafından bu enzimler bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir beta-laktam antibiyotik eklendiğinde enzim sentezinde artış olabilmektedir. Bu nedenle kalıcı direnç söz konusu olmaz. Kullanılan antibiyotik, enfeksiyon yeri, bakteri sayısı ve antibiyotiğin dağılımı dereprese mutantların ortaya çıkmasında etkilidir. Bu mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi sürekli ve yüksek düzeyde olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisi sırasında kullanılan antibiyotik duyarlı bakterilere etki ederken antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalmasını sağlayarak dirençli

HE'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Karbapenemler hem indükleyici kromozomal hem de dereprese mutantlara etkilidir. Bu nedenle dereprese mutantların seleksiyonuna neden olmazlar. İndüklenebilir kromozomal enzimler GN bakterilerde daha fazla bulunur<sup>25,64,75,76</sup>.

#### **2.7.2.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta Laktamazlar**

Bu grup 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. 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, OXA beta laktamazları *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar<sup>64,70</sup> (Çizelge 2.3).

**Çizelge 2.3.** Beta-laktamazların grupları ve genel özellikleri<sup>77-82</sup>.

Beta-Laktamaz Grup(Bush)	Molekül Sınıfı (Ampler)	Tercih Eilen Substrat	Klavulanik asitle inhibisyon	Özellikler
1	C (serin)	Sefalosporinler	-	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal Amp C enzimleri: MIR-1
2a	A(Serin)	Penisilinler	+	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	+	Çoğunlukla gram negatif bakterilerdeki GSBL (TEM-1,TEM-2,SHV-1)
2be	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar	+	Monobaktamlara dirençli olan GSBL'ler TEM-3 ila TEM-26, SHV-2 ile SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K 1.
2br	A	Penisilinler	±	İnhibitörlere dirençli beta laktamazlar: TEM-30 ile TEM-36, TRC-1
2c	A	Penisilinler, Karbenisilin	+	Karbensilini inhibe eden enzimler: PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler	±	Oksasilini hidroliz eden enzimler OXA-1 ila OXA-11(Türkiye'deki ilk), PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Sefalosporinler	+	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler Karbapenemler	+	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A, <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1
3a,3b,3c	B(Çinko)	Karbapenem dahil bir çok beta-laktam		Metallo-Beta-Laktamazlar ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın L 1, <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CcrA)
4	nD (?)	Penisilinler	-	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın penisilinazı.(Kromozomal)

### 2.7.2.3. Grup 3 Beta Laktamazlar (Metallo-Enzimler)

Metallo-beta-laktamazlar, 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 enzimlerdir. Dolayısıyla bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken, EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar<sup>83</sup>. Bu gruptaki enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. MBL'ların IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1 gibi enzimlerinin sayısı günümüzde oldukça artmıştır. Bu enzimleri kodlayan genler integronlar üzerinde yer almaktadır<sup>84,85</sup>. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları ve bu arada karbapenemleri de hidroliz edebilmeleridir<sup>83</sup>. *S.maltophilia*'nın kromozomal L-1 enzimi, *B. fragilis*'in CcrA enzimi gibi metallo-enzimler bu grupta yer alır<sup>69</sup>. Son yıllarda hızla yayılmakta olan IMP ve VIM gibi metallo-enzimleri kodlayan genler integronlarda bulunduğu için kolaylıkla yayılma özelliğine sahiptirler ve bu nedenle klinikte ciddi problem oluştururlar. Karbapenemler gibi önemli bir antibiyotik grubunu hidroliz etmelerinin yanı sıra klinikte kullanılabilir bir inhibitörlerinin olmaması da bu enzimlerin önemini arttırmaktadır<sup>86</sup>. Tüm MBL'lar imipenemi hidrolize edebilirler ancak başarılabilir güçleri oldukça değişkendir. Hidroliz oranı, bakterinin direnç düzeyine göre değişiklik gösterebilir veya göstermeyebilir<sup>87</sup>. Buna uygun olarak bu enzimlerin sınıflandırılması, öncelikle imipenem ve beta laktam hidrolizi baz alınarak alt gruplara ayrılmıştır<sup>82</sup>.

Metallo-beta-laktamazlar 1995 yılında Bush ve Rasmussen tarafından substrat profillerine göre sınıflandırılmış ve 3 fonksiyonel grup belirlenmiştir.

**Alt grup 3a'da** bulunan enzimler geniş bir hidrolitik aktiviteye sahiptir ve penisilinleri karbapenemlerden daha hızlı hidroliz ederler. Bu enzimler maksimum aktivite için çinko eklenmesini gerektirirler. Bu da çinko için düşük bağlanma affinitesi anlamına gelir<sup>82</sup>. Bu grup içerisinde *B. cereus* II, *B.fragilis*'in CcrA, *B. cepaceae*'nin PCM-1, *S.maltophilia*'nın L-1, *C.indologenes*'in IND-1-4, *C.meningosepticum*'un BlaB enzimleri yanı sıra *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae* gibi çeşitli türlerde saptanan IMP 1-18 ve VIM 1-13 enzimleri de yer almaktadır<sup>88</sup>. Bu enzimler yapısal olarak B1 alt sınıfında bulunur. Bu enzimlerin tümü

penisilinleri hidroliz eder. Katalitik çinko ilavesine ek olarak grup 3a enzimleri, maximum katalitik aktivite için suplemental iki değerlikli çinkoya ihtiyaç duyar<sup>82</sup>.

**Alt grup 3b'de** bulunan enzimler öncelikle karbapenemleri hidroliz ederler ve bunlara “gerçek karbapenemazlar” denmektedir. *Aeromonas* türlerinin metallo enzimlerini kapsar. 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<sup>88</sup>.

**Alt grup 3c'de** ise sadece *Legionella gormanii*'nin MBL enzimi yer almaktadır. Bu enzimler geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil olmak üzere yüksek sefalosporinaz aktivitesi göstermeleri ile diğer gruplardan ayrılmaktadır<sup>82,88,89</sup>.

Karbapenemler dahil beta-laktam antibiyotiklerin çoğunu hidrolize eden ve yapısal sınıflamaya göre B1 ve B3 alt sınıflarında bulunan enzimlerde aktif alan 2 çinko iyonu içerir. B2 alt sınıfının üyelerinde ise daha sınırlı substrat özgüllüğünü açıklayacak şekilde sadece 1 çinko iyonu bulunur<sup>90</sup>.

#### **2.7.2.3.1. Metallo-Beta-Laktamazların Biyokimyası**

Hem MBL hem de serin-beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağı kırarak antibiyotik direncine neden olurlar, ama iki grup enzimin etki mekanizması tamamen farklıdır. Serin beta laktamazlar ve MBL'ların ikisi de beta laktam halkalarının amidlerinin bağlanma noktasına etki ettikleri halde bu işi farklı şekillerde yaparlar. MBL'lar serin beta laktamazlardan farklı olarak geniş bir aktif bölgeye sahiptirler ve buna bağlı olarak da beta laktamlar için uygun bölge oluşturmaktadırlar<sup>91</sup>. Farklı MBL enzimleri %25'ten daha az ortak amino asit yapılarına sahip olsa da, hepsinin ortak özelliği  $\alpha\beta\alpha$  katlantısının bulunması ve aktif bölge yapılarının süperimpoze olmasıdır<sup>91</sup>.

MBL'lar aktif yapıyı belirleyen bir aminoasite etki eder ki bunun sonucu çinko iyonları koordine edilmiş olur. Sınıf B2 enzimleri dışında kalan MBL'lerde genellikle çinko bağlanma motifi histidin-X-histidin-X-aspartik asit (HXHXD) şeklindedir<sup>89,91,92</sup>.

Metallo beta laktamazların çoğu esnek bir halka yapısına sahiptir ve bu yapının beta laktam substratların bağlanmasını ve hidrolizini başlattığı düşünülmektedir. Beta laktamazlardan farklı olarak, birçok beta laktam MBL'lara substrat olabilir ve bu özellikleri çok geniş spektrumlu aktivitelerinin olmasını sağlayabilir. İlginç olarak,

MBL'ların hiçbirisi aztreonamı iyi şekilde hidrolize etmez ve aztreonamın bu özelliği nedeniyle terapötik MBL inhibitörü olabileceği ileri sürülmüştür<sup>93</sup>. Enzimler aktif bölge yapısında ortak özellikleri paylaşırsa da, beta laktamları bağlama ve hidrolize etme özellikleri değişken olabilir. Bunun en önemli örneği yapısal olarak birbirine çok benzeyen VIM-1 ve VIM-2 arasındaki farktır. Örneğin, VIM-2 birçok beta laktama VIM-1'den daha sıkı bağlanmaya yatkındır<sup>89,93</sup>.

#### **2.7.2.3.2. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-Beta-Laktamazlar**

Kromozomal olarak kodlanmış MBL enzimlerinin önemli özellikleri indüklenbilir özellikte olmalarıdır. Genelde doğada bulunan bazı bakteriler, aynı zamanda MBL enzimi de taşımaktadırlar. Bu enzimleri taşıyan çoğu bakteriler genellikle beta laktamlar antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Bu enzimleri sentezleyen mikroorganizmalar fırsatçı patojenlerdir; Bu bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler olup *S. maltophilia* ve *B. anthracis* dışında nadiren ciddi enfeksiyonlara neden olurlar. Kromozomal olarak MBL kodlayan bakteriler arasında; *B. cereus* (BC2) (52), *B. anthracis* (53), *S. maltophilia* (L1) (54), *A. hydrophilia* (CphA) (55), *C. meningosepticum* (BlaB ya da GOB-1) (56), *C. indologenes* (IND-1) (57), *L. gormannii* (FEZ-1) (58), *Caulobacter crescentus* (Mbl1 B) (59), *Myroides spp* (TUS-1, MUS-1) (60), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (61), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (62) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) (63) olarak sayılabilir<sup>94</sup>.

Kromozomal kökenli bu enzimler genellikle serin beta-laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar<sup>94</sup>. *Bacteroides spp.* ile ilgili genellikle kromozomal olarak tanımlanan bir grup MBL geni aslında aktarılabılır özelliktedir<sup>95</sup>.

#### **2.7.2.3.3. Transfer Edilebilir Metallo-Beta-Laktamazlar**

##### **2.7.2.3.3.1. Metallo-Beta-Laktamazların Aktarılmasında Kullanılan Genetik Araçlar**

Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya karbapenemlerin kullanımının artmasıyla MBL enzimi taşıyan genlerin yayıldığı düşünülmektedir<sup>96,97</sup>. Transfer edilebilir MBL içinde en yaygın bulunanlar VIM, IMP, GIM ve SPM olarak adlandırılan ailelerdir. Bu enzimleri kodlayan genler çeşitli integron yapıları içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. Bu integronlar plazmid veya transpozonla birleştiğinde

bakteriler arası transfer kolaylaşmaktadır. Sadece onları üreten türlerin yayılmasıyla yayılabilen kromozomal MBL'lerin aksine, kazanılmış ya da transfer edilebilen MBL'ların yayılımında çok büyük hızlanma görülmüştür<sup>89</sup>.

Transfer edilebilir MBL içinde bulunan IMP, VIM ve GIM-1 tipi enzimlerin büyük çoğunluğu sınıf 1 integronu içindeki gen kaseti olarak bulunsa da, IMP tipi MBL-ler bazen sınıf 3 integronu içinde bulunabilirler. İntegronlar; biri integronda diğeri gen kasetinde bulunan iki DNA bölgesi arasındaki bölgeye özgü rekombinasyon olaylarında gen kasetlerini elde etme yeteneğine sahiptir. İntegronlar, 5' korunmuş bölge, 3' korunmuş bölge ve değişken bölge olmak üzere 3 farklı bölge içermektedir<sup>89</sup>. 5' bölgesinde integras genini (*intl*), bitişik rekombinasyon bölgesini yani integras geninin yanında (*attI*) ve değişken bölgede elde edilen gen kasetinin ekspresyonunu başlatan bir promotör (tetikleyici) içerir. 3' korunmuş bölgesinde ise sulfonamidlere ve antiseptiklere direnç gelişimine neden olan *sul* ve *qac* geni bulunmaktadır. Gen kasetleri, yaklaşık 1 kb boyutunda, tek bir gen ve 59 baz element adı verilen rekombinasyon bölgesini içeren, küçük dairesel, DNA parçalarından oluşmaktadır<sup>98</sup>. Gen kaseti tek bir genin yanında 59-baz adı verilen rekombinasyon bölgesini de içermektedir. Bir integronda birden fazla gen kaseti bulunabilmektedir. Genellikle MBL enzimini kodlayan gen kasetleri yanında aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan *aacA4* geni de bulunmaktadır. Böylece amikasin, gentamisin, tobramisin, neomisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine direnç gelişimi gözlenmektedir. Aminoglikozid ve beta-laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğere serbestçe dolaşabilir, bir organizmadan diğere kendi başlarına hareket edemezler bu nedenle plazmidler ve transpozonlar gibi başka genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar MBL genlerini taşıyan plazmidlerin 120-180 kb büyüklüğünde oldukları belirlenmiştir<sup>98,99</sup>.

MBL enzim genlerini taşıyan integronların bakteriler arası yayılımından sorumlu olan diğere genetik elemanlar ise transpozonlardır. 2003 yılında İtalya'da *P.aeruginosa* izolatında blaIMP-13 MBL enzimi ve bu enzimi kodlayan geni taşıyan Tn5051-tip transpozona gömülü integron rapor edildi. Polonya'da izole edilen *P. aeruginosa*'da aynı noktada blaIMP-13 ve blaVIM-2 enzim genlerini taşıyan integronun transpozonda taşındığı ve her iki taraftaki transpozonların tnpR genlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Bu bulgular klas 1 integronların yayılımından transpozonların sorumlu olduğunu

düşündürmüştür. Bununla birlikte bütün MBL genlerinin integronlar ya da transpozonlarla ilişkili olmadığına dair raporlar da vardır<sup>100</sup>.

#### 2.7.2.3.3.1.1. IMP Tipi Metallo- Beta- Laktamazlar

Transfer edilebilen ilk MBL 1988 yılında Japonya’ da *P. aeruginosa*’nın GN17203 suşuna ait konjugatif plazmidle taşınan MBL geni tanımlanmıştır<sup>101</sup>. İmipenemi parçaladığı için enzime IMP-1 adı verilmiştir. Bu izolatın imipenem MIC değeri 50 µg/ml olarak tesbit edilmiş ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere de (örneğin seftazidim MIC >400 µg/ml) dirençli olduğu bildirilmiştir. 1991 yılında Japonya Okazaki’deki Aichi Hastanesinde üriner sistem enfeksiyonundan izole edilen *S. marcescens* Tn9106 suşunda birebir aynı gen bulunmuştur<sup>102</sup>. Daha sonra Japonya’nın çeşitli bölgelerinden aynı geni taşıyan farklı izolatlar bildirilmiştir. Belirlenen tüm enzimlerin aynı aminoasit yapısına sahip olduğu belirlenmiş ve beta laktam ajanlarla birlikte imipenemi hidrolize etme özelliğinden dolayı bu enzime IMP-1 (bla IMP) adı verilmiştir. Bu IMP-1 enzimi sınıf 3 integron üzerinde aac(6’) Ib benzeri ve 120 kb büyüklüğünde bir plazmidde bulunmuştur<sup>103</sup>.

IMP-1 *P. aeruginosa*’da tanımlanan ilk MBL’dir. Enzimin gen bölgesi olan blaIMP genin varlığı, Japonya’da *P. aeruginosa* suşları ve diğer GN basiller arasında tespit edilmeye başlanmış, daha sonra da Singapur ve Güney Kore’de bildirilmiştir. blaIMP genin integron elementler ile ilişkisi ve karbapenem antibiyotiklerinin yoğun kullanımı, Japonya’da bu direncin yayılmasına katkıda bulunmuştur<sup>104</sup>. *S. flexneri*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* izolatlarında MBL enzimi varlığı araştırılırken Japonya’da IMP-1’in 3 minör varyantı, IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tanımlanmıştır. Genetik ve kinetik çalışmalarda 169’uncu pozisyondaki serin yerine glisin geçmesinin penisiline karşı aktivitede bir azalmaya yol açtığı belirlendi. IMP-6’da izlenen bu aynı amino asit değişikliği; sadece penisilin G ve piperasiline karşı düşük aktivite göstermemiş, aynı zamanda, IMP-1’in aksine; imipenemle kıyaslandığında daha yüksek seviyede meropenem hidrolizi göstermiştir<sup>105</sup>. Bu enzimlerden biri olan IMP-3 ise *S. flexneri* izolatından elde edilmiş ve IMP-1’den yalnızca iki aminoasit bakımından farklılık gösterir. Ancak bu farklılık, IMP-3 enziminin penisilinlere olan aktivitesinin düşük olmasına neden olmuştur<sup>106</sup>.

IMP ailesinden Avrupa'da bulunan ilk enzim, İtalya' da *A.baumannii* suşunda saptanan IMP-2'dir<sup>107</sup>. Transfer edilebilir MBL'lerin sadece Japonyada sınırlı kaldığı düşünceleri IMP-2'nin 1997 yılında ve IMP-5' in 1998 yılında İtalya ve Portekiz'de görülmesinden sonra değişmiştir. IMP-2, IMP- 1'den 36 aminoasit ve IMP-5, IMP-1'den 17 amino asit değişikliği ile ayrılır. BlaIMP-2 geni aminoglikozid direncinden sorumlu aacA4 ve aadA1 allellerinin yanında bulunurken, IMP-5 tek bir gen kaseti şeklindedir<sup>89</sup>. IMP-3 ve IMP-6 'daki gen değişimlerinin MBL'ların atası sayılan BCII'de de görülmesi, IMP-3'ün IMP-1'in varyantı olmasından ziyade IMP-3'ün IMP-1'in atası olabileceği hipotezini ortaya koymuştur<sup>89,106</sup>.

1995-2001 yılları arasında Japonya'da *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* suşlarında IMP enziminin üretimi incelenirken IMP-10 bulunmuştur. BlaIMP-10 geni blaIMP-1 geninden farklı olarak 49. pozisyondaki valin yerine fenilalanin gelmesine sebep olan tek baz değişikliği ile birbirinden ayrılmaktadır. İlk başlarda MBL genlerinin sadece Japonya'da olduğu düşünülürken 1997'de bla IMP-2, 1998'de bla IMP-5 sırasıyla İtalya ve Portekiz'de görülmüştür<sup>108</sup>.

Yapılan çalışmalar da İtalya'da 2 farklı IMP varyantı daha tanımlanmıştır. 2000 yılında Varessa'da bulunan klinik bir izolat olan *P. putida* tarafından üretilen IMP- 12' nin 50 kb'lik transfer edilmeyen bir plazmid üzerinde bulunduğu saptanmıştır<sup>109</sup>. IMP-12'nin IMP-1'den 36 amino asit bakımından fark gösterdiği ve bu farkın penisilinlere karşı aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. IMP-13 enzimi ise Roma'da izole edilen *P. aeruginosa* suşunda bulunmuş ve IMP-1' den 19 amino asit bakımından farklılık gösterdiği bulunmuştur<sup>100</sup>. Yakın zamanda İngiltere'de *A. baumannii* ve *A. junii* kökenlerinde IMP-1 genini göstermişlerdir. Bulunan *A.junii* kökeninin İspanya'da tatilde olan ve İngiltere'ye geri dönmeden önce, 4 hafta gibi süre oradaki hastanede kalan kadın hastadan izole edildiği bildirilse de genetik açıdan detaylı bilgiler henüz tam anlamaya açıklığa kavuşmamıştır.

1994 ve 1995 yıllarında Hong Kong ve Kanada'da IMP-4 ve IMP-7 tanımlanmıştır. MBL geni olan bla IMP-4 1994-1998 yılları arasında, imipeneme dirençli kökenlerin %66'sında ortaya çıkarılmıştır<sup>110</sup>. Kanada'da IMP-7 klonal *P.aeruginosa* salgınına yol açmış, Tayvan'da IMP-8 bulunmuştur. IMP-8, IMP-1'e kıyasla IMP-2'ye daha benzer bulunmuştur<sup>111</sup>. IMP varyantı olan IMP-8 Tayvan'daki Uluslararası Cheung Kung Hastanesinde bulunmuş ve bu enzime ait gen bölgesinin,

1998 yılında izole edilen *K. pneumoniae*'da bulunan aacA4 gen gölgesinin yanında ki sınıf 1 integronu içinde yer aldığı belirlenmiştir<sup>112</sup>.

Dünya çapındaki SENTRY çalışmasında Brezilya'dan 5 tane IMP-1 ve yeni bir IMP olan IMP-16 tanımlanmıştır. New Mexico'da *P. aeruginosa*'da IMP-18 bulunmuştur<sup>113</sup>.

#### **2.7.2.3.3.1.2. VIM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar**

Kazanılmış MBL'lerin ikinci dominant grubu VIM tipi (Verona Integron Encoded Metallo- $\beta$ -Lactamase) enzimlerdir. VIM-1 ilk olarak 1997 yılında Verona İtalya'da bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. 1997'de elde edilen bu klinik izolat piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam gibi çeşitli beta laktamlara dirençli bulunmuştur. İmipenem MİK değerinin  $>128 \mu\text{g/ml}$  olduğu görüldü. Biyokimyasal analiz, EDTA ile inhibe olan ve  $\text{Zn}^{+2}$  eklenmesiyle yeniden kazanılan karbapenem hidrolizi gösteren bu kökenin kaba ekstresinden yapılmıştır. Bu gözlemler bir metallo enzim üretimini düşündürmüştür. Beta laktamaz geni klonlanmış ve diğer MBL'lardan uzaktan ilişkili olan VIM (Veronese İmipenase) ortaya konmuştur. VIM-1 diğer metallo enzimlerle yapısal benzerlikler göstermiştir. Sadece %39 aminoasit ortaklığı olan BCII daha yakın ilişkide olduğu bulunmuş, daha sonra aztreonam dışındaki çoğu beta laktamı hidrolize eden tipik B sınıfı enzimi olan VIM-1'in hidrolitik profili analiz edilmiştir. Bla IMP gibi bla VIM geni de sınıf 1 integron içindeki bir gen kasetindedir Bu integron, sınıf 1 integronların tipik bir integratör genini ve blaVIM gen kasetine ek olarak, aminoglikozid direnci kodlayan bir aacA4 gen kasetini taşımaktadır<sup>114</sup>. Sonrasında, bir bla VIM-1 geni Verona'daki aynı hastanede *Achromobacter xylosoxidans*'ta bulundu. Karbapenemler dahil bütün beta laktamlara direnç göstermekteydi. Ayrıca, VIM-1 İtalya'da HE kaynağı olup, *P. putida* izolatlarında da tespit edilmesi çevresel izolatların MBL'lerin kaynağı ya da en azından vektörleri olduğu görüşünü desteklemiştir<sup>115</sup>. VIM-1 ayrıca Yunanistan'da *E. coli* ve birkaç *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir<sup>116</sup>.

Bla VIM-2 ilk olarak 1996'da Fransa'nın güneyinde nütropenik bir hastanın kan kültüründeki *P. aeruginosa* izolatında identifiye edilmiştir<sup>89,117</sup>. Bu izolat, seftazidim, sefepim ve imipenem gibi birçok beta-laktama dirençli iken aztreonama duyarlıdır. VIM-2 VIM-1'e çok benziyordu ve bir gen kaseti tarafından kodlanmıştı, VIM-1 ve

VIM-2 arasında % 90 aminoasit ortaklığı söz konusudur. Dizi heterojenliği VIM-1 ve VIM-2'nin çoğunlukla NH<sub>2</sub> ve karboksi terminal bölgelerinde görülmektedir. blaVIM-2 pozitif sınıf 1 integronlarda tespit edilen tek direnç geni bu izolattaydı<sup>118</sup>. Daha sonra, Marsilya Fransa'da 1995-1999 yılları arasında 10 ayrı VIM-2 pozitif *P. aeruginosa* izolatu identifiye edilmiştir. Bu izolatlar aynı genotipik paterne sahipti, ama blaVIM-2 geni taşıyan sınıf 1 integronlar büyüklük ve yapı bakımından değişiklik gösteriyordu<sup>118</sup>. Benzer şekilde VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları İtalya ve Yunanistan'da salgın kaynağı olarak bulunmuştur. VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezuela, Arjantin, Belçika gibi ülkelerden bildirilmiştir<sup>89,119</sup>.

VIM-3, yakın zamanda Tayvan'da *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve VIM serisinin yeni ortaya çıkan varyantı olarak identifiye edilmiştir. VIM-3'ün amino asit yapısı VIM-2'den 2 amino asit oynamayla değişir. blaVIM-3 geninin kromozom üzerindeki yeri fark edilmesine rağmen kesin genetik yapısı hala bilinmemektedir<sup>120</sup>.

VIM-4 Yunanistan'da bir *P.aeruginosa* izolatında bildirilmiştir. Bu köken daha önce imipenem kullanmış bir hastadan elde edilmişti ve bu da beta laktamlara dirençli iken, aztreonama karşı aktivitesini korumaktaydı. VIM-4, VIM-2 ve VIM-3 te olduğu gibi, VIM-1'den sadece bir amino asit değişikliğiyle (Ser175Arg) ayrılır.VIM-1'den 1 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-4 üreten, *P.aeruginosa* izolatu İsveç'te de tanımlanmıştır ancak izolatin Yunanistan'dan gelen bir hastadan olduğu görülmüştür<sup>121</sup>. Bla VIM-4 'ün bu iki izolatta da aynı plazmid tarafından kodlandığı halde karbapenem MİK düzeylerinin çeşitliliği oldukça ilginç karşılanmıştır. Polonya'da yürütülen bir çalışmada klonal olarak ayrı çeşit VIM-4 üreten *P.aeruginosa* kökenleri olduğunu göstermiştir<sup>121</sup>.

VIM-5, VIM-1'den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır ve ilk olarak Türkiye'de Ankara'da *K. Pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir. Bla VIM-5'in identifiye edildiği *P. aeruginosa* izolatu aztreonem dahil bütün beta laktamlara dirençli olduğu görülmüştür<sup>122</sup>.

VIM-6 Singapur'dan iki *P. putida* izolatında identifiye edildi. Bu izolatlar β-laktamlara yüksek derecede dirençliydi, imipenem ve meropenem MIC değerleri >32µg/ml, seftazidim için >256µg/ml ve aztreonam için 128µg/ml bulundu. VIM-6 ise VIM-2'den iki amino asit değişikliği (59. pozisyonda glutamin/arjinin ve 165.

pozisyonda asparajin/serin) ve VIM-3'den sadece bir amino asit değişikliği ile ayrılıyordu<sup>123</sup>.

VIM-7, Houston Teksas'tan bir karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. VIM-1 ile %77 ve VIM-2 ile %74 benzerliği olup, VIM-tipi  $\beta$ -laktamazlar arasında yeni bir üçüncü subgrup oluşturur. BlaVIM-7 integron kökenli gibi gözükmektedir. Aztreonam ve polimiksin B hariç diğer antibiyotikler ve  $\beta$ -laktamlara dirençli olan klinik bir izolattan identifiye edilmiştir<sup>124</sup>.

Yeni blaVIM genlerinin ilki Kolombiya'da *P.aeruginosa*'dan izole edilen blaVIM-8, Güney Amerika'da sayıları hızla artan blaVIM genlerine bir yenisini eklemiş oldu. Ayrıca, İngiltere'den blaVIM-9 ve blaVIM-10 Arjantin ve İtalya'dan blaVIM-11 bildirilmiştir. Son olarak Türkiye'den VIM-38 bildirilmiştir<sup>199</sup>(Çizelge 5).

VIM-1 ve VIM-2 birkaç değişik *Enterobacter* türlerinden identifiye edilmiş olsa da, bu enzimlerin bilinen en önemli rezervuarı *P. aeruginosa*'dır.

#### **2.7.2.3.3.1.3. SPM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar**

1997 yılında Brezilya Sao Paulo'da bir *P.aeruginosa* klinik izolatu, SENTRY araştırma programı parçası olarak tanımlanmış ve blaSPM-1 (Sao Paulo MBL) olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı gösterilmiştir. İzolatın, aztreonam ve kolistin dışında standart bütün GN bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM-1, beta laktamlardan penisilin, ampisilin, piperasilin, karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızlı hidrolize etme yeteneğine sahipken enzimin sefalosporinlere afinitesi daha fazladır<sup>125</sup>. SPM-1 diğer MBL'ler ile kıyaslandığında benzerlikler, IMP-1 ile %35,5, ImiS ile %32,2, BCII ile %30 olduğu görülmüştür. IMP ve VIM'den önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Aktif bölgeden sonra gelen, 24 aminoasitlik bir insersiyon bulunmaktadır. Bu insersiyonun beta laktamları hidrolize eden bir halka olarak çalıştığı gösterilmiştir<sup>125</sup>.

Bla SPM'nin genetik içeriği tektir ve diğerlerinden farklıdır. Bu enzimin genetik analizler sonucunda integronda ya da transpozonda bulunmayıp, CR4 adı verilen yeni bir ortak bölgede yer aldığı görülmüştür. 180 kb'lik bir plazmidde bulunduğu belirtilmiştir. IMP-1 ve VIM-1'deki gibi SPM-1 de klavulanik asit ya da aztreonamı hidroliz etmez, yarışmacı inhibitör olarak çalışır<sup>125</sup>.

#### 2.7.2.3.3.1.4. GIM-1 Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar

2002 yılında Almanya Dusseldorf’da farklı tıp merkezlerinden farklı hastalardan beş *P.aeruginosa* izolatu elde edildi ve GIM-1 diye adlandırılan yeni bir sınıf-B beta laktamaz içerdiği gösterildi (German Imipenemase). IPM ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. Bu isolatlar sadece polimiksin B ye duyarlıydı. Pulsed-field jel elektroforez analizi ile beş *P.aeruginosa* izolatu ayırt edilemiyordu. GIM-1 enziminin amino asit dizilimi IMP-6 (% 43.5), IMP-1(%43.1) ve IMP-4 (%43.1) ile benzerlik göstermektedir. GIM-1 VIM enzimleri ile VIM-7 (% 31,2), VIM-1, VIM-4 ve VIM-5 (% 28,8) ve SPM-1 (% 28.0) ile de benzerlik göstermektedir.

MBL’lerin çoğunda olduğu gibi (SPM-1 enzimi dışında) bla GIM-1, 45 kb’lık küçük bir plazmidde taşınan sınıf 1 integronda bulunur. Bu integron içerisinde ayrıca iki aminoglikozid direnç genleri (aaaA4 ve aadA1) ve bir beta laktamaz geni (blaOXA-2) gibi üç tane daha direnç gen kaseti de bulunmaktadır<sup>82,126</sup>.

IMP ve VIM tipi transfer edilebilir MBL’ler tüm dünyada yayılmaya devam ederken, SIM, GIM ve SPM tipi enzimlere halen ilk rapor edildikleri ülkeler dışında rastlanmamıştır<sup>107</sup>. GIM-2 Almanya’da *P. aeruginosa*’da saptanmıştır ve yapılan çalışmalarda GIM-1 ile moleküler farkı olmadığı belirlenmiştir<sup>200</sup>.

#### 2.7.2.3.3.1.5. NDM-1 (New Delhi Metallo-Beta-Lactamase)

Yeni Delhi metallo-beta laktamaz yeni tanımlanmış bir beta laktamazdır. NDM-1 ilk defa 2009 yılında İsveç’te Hindistan’lı USE’lu bir hastadan izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır. Bu suş kolistin ve aztreonam dışında bütün antibiyotiklere direnç göstermiştir. NDM’in moleküler büyüklüğü 28 kD dur ve monomeriktir ve diğer MBL’ler gibi EDTA ile inhibe olur<sup>127</sup>.

NDM’in ilk olarak rapor edilmesinden sonra, Hindistan Mumbai’de 22 olgu daha belirtilmiştir. NDM -1 daha sonra İngiltere’de ve Amerika’da da görülmüştür<sup>128</sup>. 2010 yılında Kanada<sup>129</sup>, Japonya’da ve Orta Doğu’da (Umman) NDM ilk olgu olarak görülmüştür<sup>130</sup>. 2011 mayıs ayında İsviçre’de NDM-1 ilk olgu olarak gösterilmiş daha sonra aynı yılın haziran ayında Balkan ülkelerinde ilk olgu olarak rapor edilmiştir. NDM-1 ayrıca daha sonra *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae*, and *M. morgani* gibi GN bakterilerde de üretilmiştir.<sup>131,132</sup>.

NDM-1 üretebilen patojenlerin ortaya çıkması dünya genelinde önemli bir problemdir. NDM-1 üreten bakteriler, birçok diğer antibiyotik gruplarında olduğu gibi, karbapenemleri de içeren beta-laktamlara oldukça dirençlidir. Bu geniş spektrumlu direnç, NDM-1 üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. NDM-1 üreten suşların diğer bakterilere direnç genlerini transfer edebilme özelliklerinden dolayı, bu direnç paterninin dünya genelinde yayılma potansiyeli mevcuttur<sup>133</sup>.

İlk DIM-1 tipi MBL Hollanda'da *P. stutzeri* kökeninden izole edilmiştir. Sınıf 1 integrona gömülmüş DIM-1 aztreonam hariç, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve karbapenemleri önemli ölçüde hidrolize eder. İlk AIM-1 tipi MBL enzimi de Avustralya'da *P. aeruginosa* kökeninde tespit edilmiştir<sup>134</sup>.

KHM-1 ise, 1997 yılında Japonya'da Kyorin Üniversitesi Hastanesi'nde kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu olan hastadan üretilen *C. freundii*'den izole edilmiştir<sup>135</sup>. Çoğu beta-laktam antibiyotiğe dirençlidir. Libya'nın Tripoli Merkez Hastanesi'nde DIM-1 ve GIM-1 tipi MBL ile benzerliği yüksek olan sınıf 1 integronda taşınan TMB-1 tipi MBL, *A. xylosoxidans* kökenlerinde saptanmıştır. Son olarak İtalya Floransa'dan bildirilen, FIM-1 tipi MBL vasküler greft enfeksiyonu olan bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa* kökeninde saptanmıştır. FIM-1 en yüksek benzerliği NDM tip enzimlere göstermektedir<sup>136,137</sup>.

Çizelge 2.4. İmipenemaz tipi MBL'lerin bulunduğu bakteriler ve bildirilen ülkeler

İmipenemaz tipi Metallo-Beta-Laktamazlar		
Beta-laktamazlar	Bulunduğu bakteri	Bildirilen ülke
IMP-1	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
	<i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>Klepsiella, Achromobacter, Alcaligenes, Citrobacter, Enterobacter, E. coli, Proteus, Providencia, Serratia</i> )	Japonya
	<i>A. baumannii</i>	Japonya
	<i>A. xylooxidans</i>	Japonya
	<i>P. stutzeri</i>	Japonya
	<i>P. putida</i>	Japonya
	<i>P. fluorescens</i>	Singapur
IMP-2	<i>A. baumannii</i>	İtalya
	<i>A. lwoffii</i>	Japonya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-3	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
IMP-4	<i>A. baumannii</i>	Çin-Hong Kong
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Çin
IMP-5	<i>A. baumannii</i>	Portekiz
IMP-6	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Kanada
IMP-8	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
	<i>A. baumannii</i>	Çin
	<i>P. mendocina</i>	Portekiz
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	Çin
IMP-10	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
	<i>A. xylooxidans</i>	Japonya
	<i>A. baumannii</i>	Japonya
IMP-11	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-12	<i>P. putida</i>	İtalya
IMP-13	<i>P. aeruginosa</i>	İtalya
IMP-14	<i>P. aeruginosa</i>	Tayland
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	Meksika
IMP-16	<i>P. aeruginosa</i>	Brezilya
IMP-18	<i>P. aeruginosa</i>	USA
IMP-19	<i>A. caviae</i>	Fransa
IMP-20	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-21	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-22	<i>P. aeruginosa</i>	Avusturya
IMP-24	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
IMP-25	<i>P. aeruginosa</i>	Çin
IMP-26	<i>P. aeruginosa</i>	Singapur
IMP-29	<i>P. aeruginosa</i>	Fransa
IMP-35	<i>P. aeruginosa</i>	Hollanda, Almanya sınırında

Çizelge 2.5. VIM, SPM, GIM tipi MBL enzimleri

VIM Tipi Metallo-Beta-Laktamazlar		
Beta-laktamazlar	Coğrafik yayılım	Kodlayıcı gen yerleşimi
VIM-1	İtalya( <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.xyloxidans</i> , <i>P.putida</i> ), Fransa, Yunanistan ( <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> )	Plazmid veya Kromozomlardaki integronlar
VIM-2	Fransa, İtalya, Yunanistan, İspanya, Almanya, Portekiz, Polonya, Rusya, İrlanda, Türkiye, Venezuela, Kore, Japonya, Çin, Suudi Arabistan, Hindistan, ABD, Kolombiya, Kanada. <i>P. aeruginosa</i>	“
VIM-3	Tayvan ( <i>P. aeruginosa</i> )	“
VIM-4	Yunanistan ( <i>P.aeruginosa</i> ), Macaristan, Polonya, İsveç ( <i>P.aeruginosa</i> ), İtalya ( <i>K. pneumoniae</i> )	“
VIM-5	Türkiye ( <i>P. aeruginosa</i> , <i>K pneumoniae</i> )	“
VIM-7	ABD ( <i>P. aeruginosa</i> )	“
VIM-8	Kolombiya ( <i>P. aeruginosa</i> )	
VIM-9	İngiltere ( <i>P. aeruginosa</i> )	
VIM-10	İngiltere ( <i>P. aeruginosa</i> )	
VIM-11(a,b)	Arjantin, İtalya ( <i>P. aeruginosa</i> )	“
VIM-13	İspanya	“
VIM-15	Bulgaristan	“
VIM-16	Almanya	“
VIM-38	Türkiye ( <i>E.coli</i> )	İntegron
SPM-1	Brezilya	Plazmid
GIM-1	Almanya	Plazmid ve İntegron
GIM-2	Almanya	İntegron

#### 2.7.2.3.4. Metallo-Beta-Laktamazların Araştırılması

Bakterilerde MBL enzim genlerinin tesbit edilmesi GSBL'nin erken tesbiti kadar önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ama bugüne kadar

*Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, *P.aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin MBL direnç geni taşıdığını tesbit eden standart fenotipik yöntem ve test kriteri ortaya konulamamıştır. Örneğin *Enterobacteriaceae*'lerin çoğu ve bazı *Acinetobacter spp.* türleri MBL enzimi taşıdığı halde 1–2 µg/ml imipenem MIC değerleri ile duyarlı görünecektir. Bu nedenle MBL tespitinde tarama plağı uygulamasında bakteri türü dikkate alınmalıdır. Örneğin *Pseudomonas*'lar *Enterobacteriaceae*'lerden daha yüksek karbapenem MIC değerlerine sahiptir<sup>138,139</sup>.

CLSI tarafından MBL üreten mikroorganizmaların saptanması için bir yönerge bulunmamaktadır. Bu tür bakterileri saptamak için birkaç fenotipik yöntem vardır. Bu yöntemler EDTA, tiol temelli bileşiklerin MBL aktivitelerini inhibe etme yeteneğine dayanmaktadır. Ancak bugüne kadar duyarlılığı ve özgüllüğü belirlenip standardize edilen bir test henüz bulunmamıştır. MBL'lerin araştırılması için tanımlanan yöntemler arasında fenotipik olarak imipeneme duyarlı *E.coli*'nin MBL üreten bakteri ile birlikte bulunduğu inhibisyon zonunun azalmasıyla değerlendirilen Modifiye Hodge Testi, EDTA veya 2-merkaptopropionik asitin kullanıldığı imipenem veya seftazidimli çift disk sinerji testi, 2-mercapto-propionik asit ya da EDTA'nın kullanıldığı seftazidim veya imipenem kombinasyonlu disk testi, MBL E testi, mikrodilüsyon testi ve moleküler bazlı PCR'dir<sup>140</sup>.

Günümüzde MBL'lerin saptanması için tanımlanan fenotipik yöntemlerden çift disk sinerji ve Modifiye Hodge testi zor ve yorumlanması subjektiftir. Bu yöntemler teknik açıdan zaman alıcıdır. Şelatör olarak kullanılan 2-merkaptopropionik asit toksiktir ve çalışma için özel önlemler gerekir. Rutinde bu yöntemlerin kullanımı uygun değildir<sup>141</sup>. MBL üretimini saptamak için oldukça duyarlı basit bir fenotipik yöntem bildirilmiştir. Bu yöntem EDTA'lı imipenem kombine diskleri ile yapılmıştır<sup>142</sup>.

MBL inhibitörü olarak tanımlanan  $CuCl_2$ ,  $FeCl_2$ , EDTA, Thiol Bileşikleri (mercaptoasetik asit, 2-merkaptopropionic acid, mercaptoethanol) IMP-1 inhibisyonu için kullanılıp değerlendirilmiştir. Bu ajanların MBL'yi bloke ettiği raporlanmıştır<sup>143</sup>.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Haziran-Ekim 2012 ve Şubat-Mart 2014 tarihleri arasında, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen idrar, yara yeri sürüntüsü, abse, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat, püy, kan, beyin-omurilik sıvısı gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilen 261 adet karbapeneme direnç gösteren GN bakteri toplanmıştır.

#### 3.1. Klinik Örneklerden İzolasyon

Kliniklerden gelen örnekler MacConkey agar (MCK; bioMerieux) ve %5 Koyun kanlı agara (COS; bioMerieux) ekim yapılarak 35-37°C'de, 24 saat inkübe edildi. Bunların pasajları yapılarak saf kültürleri elde edildi. GN suşların koloni morfolojileri ve laktoza etkileri incelendi. Mikroskopik morfolojinin incelenmesi Gram boyama yönteminin uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Klasik identifikasyon yöntemlerini kapsayan Gram boyama, oksidaz testi yapılmasının ardından kesin identifikasyon için de Vitek 2 (Biomérieux, France) tam otomatize sistemine ait identifikasyon kartları kullanıldı.

##### 3.1.1. Vitek 2 Otomatize Sistem

Suşların identifikasyonu için rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize sistem kullanıldı. Gram negatif identifikasyon kartı (bioMerieux) kullanıldı. Steril tuzlu sudan (% 0.45-0.50 NaCl, pH 4.5-7.0) sistem için özel kullanılan şeffaf plastik deney tüpüne (12x75 mm) 3 ml konuldu. Tüpe öze ile saf koloniler aktarıldı ve 0,5 McFarland'a ( $10^8$  CFU/ml) eşdeğer yoğunlukta homojen bir süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon tüpü, GN kartı kasete yerleştirildi. Veri girişi ve kasetin cihaza yüklenmesi Vitek 2 otomatize sistem kullanım talimatına uygun şekilde yapıldı. Sonuçlar bilgisayar sisteminden kontrol edildi.



Şekil 3.1. 0.5Mc Farland bulanıklığı

### 3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Karbapenem Direnci

İzolatların antibiyotik paternleri Vitek 2 (bioMérieux. SA, France) otomatize sistemi ile yapıldı. Bu çalışmada antimikrobiyal ajan olarak amikasin, amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, ampisilin, piperasilin, sefazolin, sefoksitin, seftriakson, sefuroksim, trimetoprim/sülfametaksazol, seftazidim, ertapenem, gentamisin, ciprofloksasilin, levofloksasin, tetrasiklin, imipenem, doripenem, meropenem, sefepim, ve tigesiklin kullanıldı.

Bu suşlardan VİTEK 2 otomatize sistemi ile İmipenem (IMP) ve/veya Meropenem (MEM) ve/veya Ertapenem (ERT)'ne dirençli olduğu görülen suşlar çalışmaya dahil edilmek üzere ayrıldı. Bu karbapeneme dirençli 261 GN mikroorganizma daha sonra kullanılmak üzere mikrobank saklama tüpüne pasajlanarak -20°C'de saklandı.

### 3.3. MBL Tesbitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler

#### 3.3.1. Modifiye Hodge testi

“Modifiye Hodge Test” (MHT), diğer testlerin aksine MBL enziminin EDTA varlığında inhibe olması prensibi üzerine kurulmamıştır. MHT, imipeneme duyarlı bir bakteri izolatının, MBL üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu, inhibisyon zonunun bozulması temeline dayanmaktadır. MHT'inde imipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Taze pasajlarından elde edilen *E.coli* ATCC 25922 standart suşu, steril tuzlu su solüsyonunda 0,5 Mc Farland bulanıklığında hazırlanarak

CLSI' nin önerdiği disk difüzyon yönteminde olduğu gibi Müller-Hinton agar plağının yüzeyine ekildi. Plağın ortasına steril pens yardımıyla imipenem (10µg ) diski yerleştirildi. Test edilecek olan bakteriler, diskin kenarından plağın dört tarafına merkezden periferine doğru öze yardımıyla düz çizgi şeklinde ekildi. Plaklar 36–37°C lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Test sonuçları imipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 suşunun duyarlılık zon çapının çizgi ekimi yapılan bakteri taraflarında yonca yaprağı (cloverleaf shaped) şeklinde bozulması ve bu bölgede *E. coli* üremesinin görülmemesi MBL üretimi yönünde pozitif test sonucu olarak değerlendirildi.

### **3.3.2. Kombine Disk Difüzyon Testi (KDD)**

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin steril tuzlu su solüsyonunda 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile ticari olarak temin edilen suşları CLSI' nin önerdiği disk difüzyon yönteminde olduğu gibi Müller-Hinton agar plağının yüzeyine ekildi. Besiyerinin kurumasını takiben plak içerisine aralarında 22 mm olacak şekilde steril pens yardımıyla 2 tane imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanan 0,5 M'lık EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle eklendi. Plaklar 36–37°C lik etüvde bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda EDTA'lı ve EDTA'sız imipenem disklerinin zon çapları ölçüldü. EDTA solusyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu, tek başına imipenem diski zon çapından  $\geq 7$  mm ise MBL pozitif bakteri izolatu olarak kaydedildi.

#### **3.3.2.1. EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) Hazırlanışı**

Ticari olarak hazır elde edilen EDTA tozu ile 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlandı. Bunun için 9,305 g disodium EDTA.H<sub>2</sub>O tozu 50 ml'lik steril distile suda çözülerek pH 8.0'e ayarlandı. pH ayarlanırken %1 lik NaOH kullanıldı. MBL inhibitörü olarak, IMP/EDTA Kombine disk ve Çift disk sinerji testlerinde kullanıldı.

#### **3.3.3. Çift disk Sinerji Disk Testi (ÇDS)**

Çift disk sinerji testinde amaç, imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tesbit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır.

Bunun için taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile ticari olarak alınan Mueller-Hinton agar besiyerine CLSI'nin önerdiği şekilde yayıldı. Plak üzerine imipenem (10µg) diski yerleştirildi. İmipenem diskinin merkezinden 20 mm uzağına daha önce hazırlanan steril boş disk yerleştirildi. Boş disk üzerine önceden hazırlanan 0,5 M EDTA solüsyonundan mikropipetle 10µl eklendi. Plaklar 36-37°C lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alındı. İnkübasyon sonrasında imipenem diski inhibisyon zonunun, EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirildi. Bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları MBL üreten pozitif suş olarak kaydedildi.



Şekil 3.2. Mueller Hinton agarda diskler arası 20' mm lik mesafe

Sonuçların kalite kontrolü olarak, Modifiye Hodge testinde imipeneme duyarlı *E. coli* "American Type Culture Collection" ATCC 25922 ve daha önce MBL ürettiği fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmiş ve enzim tipi tayin edilmiş *P.aeruginosa* ATCC 27853 izolatlarıyla yapıldı. Bu pozitif kontrol suşu VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-5, IMP-1, IMP-2 ve SPM-1 üreten *P.aeruginosa* izolatından oluşmaktadır.

**İstatistiksel Değerlendirme:** İstatistik analiz, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS ve Chi-square programı kullanılarak yapıldı. İstatistik analizlerde kategorik veriler ki-kare test istatistiği ile incelendi ve  $p < 0.02$  ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamız Haziran-Ekim 2012 ve Şubat-Mart 2014 tarihleri arasında, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'ne çeşitli kliniklerde yatan ya da ayakta tedavi gören hastalardan gönderilen idrar, yara yeri sürüntüsü, abse, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat, pü, kan, beyin-omurilik sıvısı gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilen 261 adet karbapenem direnç gösteren GN bakteri çalışmaya alınmıştır. Suşların identifikasyonu ve antibiyogramı Vitek 2 otomatize cihazında (İmipenem, Meropenem, Ertapenem ve Doripenem'den az birine direnç gösteren toplam 261 adet GN bakteri) gerçekleştirildi.

### 4.1. Karbapenem Dirençliliği

Suşların karbapenem grubu antibiyotiklere direnç dağılımı incelendiğinde 261 suşun 236'sı İmipenem, 194'ü Meropenem, Ertapenemin kullanıldığı panellerde 89 suşun 41'i Ertapenem ve Doripenemin kullanıldığı 31 suşun 25'i doripenem direnç göstermiştir. Ayrıca 7 suş İmipenem orta hassas, 12'si Meropenem orta hassas, 6'sı da Doripenem orta hassas olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Suşların karbapenemlere direnç oranları (Sayı/%)

İmipenem	236 (90.4)
Meropenem	194 (74.3)
Ertapenem	41 (46.06)
Doripenem	25 (80.6)
İmipenem OH	7 (2.6)
Meropenem OH	12 (4.5)
Doripenem OH	6 (19.3)

## 4.2. Çalışılan İzolatların Tür Dağılımı

Çalışmada izole edilen karbapeneme dirençli GN bakteriler: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *E. meningoseptica*, *A.xylosoxidans*, *K.oxytoca*, *P. rettgeri*, *Proteus spp.* ve *Acinetobacter spp.* (Çizelge 4.2 ve 4.3).

**Çizelge 4.2.** Çalışmaya alınan 261 suşun tür dağılımı (Sayı/%)

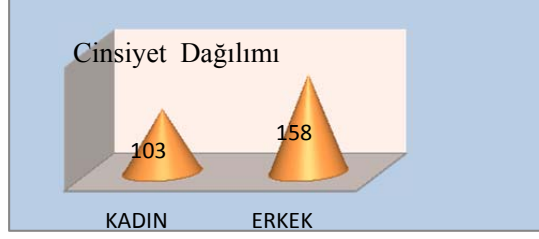
<i>A. baumannii</i>	104 (39.8)
<i>P.aeruginosa</i>	58 (22.2)
<i>K. pneumoniae</i>	37 (14.2)
<i>P. mirabilis</i>	17 (6.5)
<i>E.coli</i>	12 (4.6)
<i>S. maltophila</i>	9 (3.4)
<i>M. morgani</i>	7 (2.7)
<i>E. cloacae</i>	6 (2.3)
<i>P. stuartii</i>	2 (0.8)
<i>S. marcescens</i>	2 (0.8)
Diğerleri*	7(2.8)

**Çizelge 4.3.** Çalışmaya alınan 261 suşun *Enterobacteriaceae* ve non-*enterobacteriaceae*'ye göre dağılımı

<i>Enterobacteriaceae</i>	Sayı/Yüzde:86/33.04	<i>Non-enterobacteriaceae</i>	Sayı/Yüzde:175/67.12
<i>K. pneumoniae</i>	37 (14.2)	<i>A. baumannii</i>	105 (40.3)
<i>P. mirabilis</i>	17 (6.5)	<i>P.aeruginosa</i>	58 (22.2)
<i>E.coli</i>	12 (4.6)	<i>S. maltophila</i>	9 (3.4)
<i>M. morgani</i>	7 (2.7)	Diğerleri*	3(1.14)
<i>E. cloacae</i>	6 (2.3)		
<i>P. stuartii</i>	2 (0.8)		
<i>S. marcescens</i>	2 (0.8)		
Diğerleri*	3(1.14)		

\*: *A. xylosoxidans*, *B. cepacia*, *E. meningoseptica*, *K. oxytoca*, *P. rettgeri*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*

Çalışmaya dahil edilen 261 şusun 158'i (%60.5) erkek, 103'ü (%39.5) ise kadın hastadan izole edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hastaların cinsiyet dağılımı

### 4.3. Materyallerin Gönderildiği Kliniklere Göre Dağılımları

Merkez laboratuvarına gelen örneklerin servis ve/veya polikliniklere göre dağılımı incelendiğinde; en çok örneğin sırasıyla; Dahiliye YB, Yanık ünitesi, Reanimasyon, Çocuk YB'dır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Suşların gönderildiği klinikler (Sayı/%)

<b>Dahiliye YB-2</b>	<b>40 (15.3)</b>
<b>Yanık Ünitesi</b>	<b>37 (14.2)</b>
<b>Reanimasyon</b>	<b>27 (10.3)</b>
Çocuk YB	23 (8.8)
Genel Cerrahi YB	13 (5.0)
Beyin Cerrahi YB	12 (4.6)
Dahiliye Onkoloji Servisi	9 (3.4)
Çocuk Sağlığı 1 ve 2 servisi	9 (3.4)
Nöroloji YB	7 (2.7)
Plastik ve Rekonstrüktif Cerr. Servis	7 (2.7)
Dahiliye Hematoloji Servisi	6 (2.3)
Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	6 (2.3)
Göğüs Hastalıkları Servisi	6 (2.3)
Dahiliye Nefroloji Servisi	5 (1.9)
Çocuk Nefroloji Polikliniği	4 (1.5)
Genel Cerrahi Servisi	4 (1.5)
Kadın hastalıkları ve Doğum Polikli.	4 (1.5)
Çocuk Cerrahi Polikliniği ve Servisi	3 (1.1)
Dahiliye Gastroentoloji Servisi	3 (1.1)
Süt çocuğu Servisi	3 (1.1)
Çocuk Yenidoğan YB	3 (1.1)
Diğerleri ** ( her birinden ikişer tane)	20 (7.6)
Diğerleri * (biretane)	10 (3.8)

\*: Beyin Cer. Ser., Çocuk Alerji-İmm. Polik., Çocuk Cerrahi Polikliniği, Çocuk Yenidoğan Ser., Dermatoloji Polik.ve Ser., Dahiliye Romatoloji ve İmm. Ser., Doğumhane, Göz Hast. Servisi, Koroner YB, Üroloji Ser.ve YB.

\*\* : Çocuk Acil Tıp, Çocuk Cerra. Servisi, Çocuk Enfek. ve Hematoloji Ser., Dahiliye Endokrinoloji Polik. ve Ser., Fiziksel Tıp-Rehabilitasyon Ser., Girişimsel Radyoloji Ser., Göğüs Cer. Ser., Kalp Damar Cer. Post-Op YB, Nöroloji Ser.

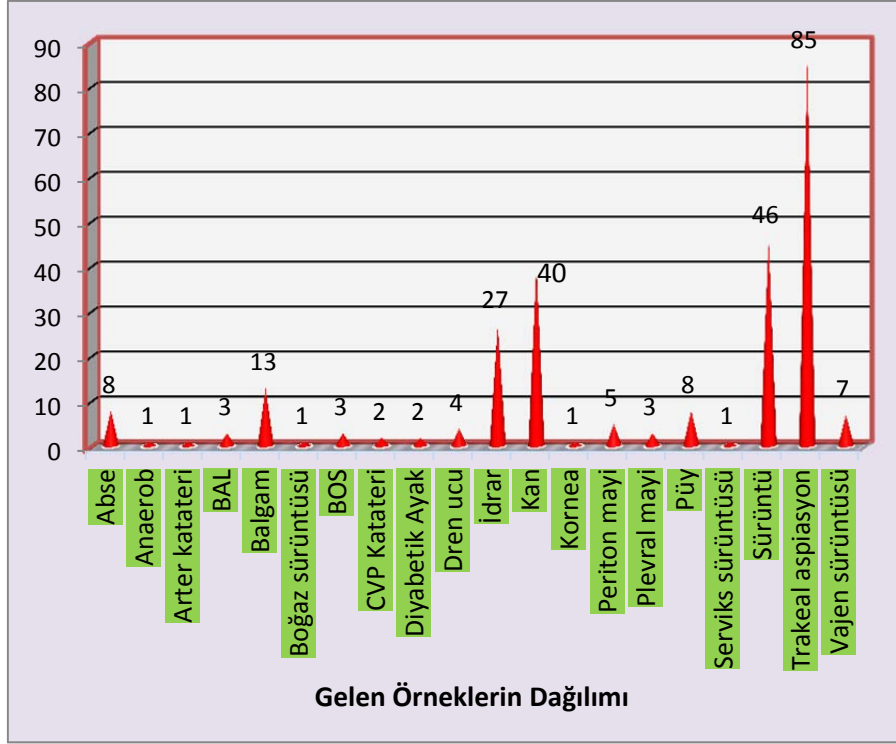
#### 4.4. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı

Karbapenem direncinin belirlendiği şuşların izole edildikleri örnek tiplerine göre dağılımı incelendiğinde en fazla örneğin sırasıyla trakeal aspirasyon, sürüntü, kan ve idrardan elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.5. İzolatların klinik örneklere göre dağılımı-1 (Sayı/%)

<b>Trakeal aspirasyon</b>	<b>85 (32.6)</b>
<b>Sürüntü</b>	<b>46 (17.6)</b>
<b>Kan</b>	<b>40 (15.3)</b>
İdrar	27 (10.3)
Balgam	13 (5.0)
Abse	8 (3.1)
Püy	8 (3.1)
Vajen sürüntüsü	7 (2.7)
Periton mayi	5 (1.9)
Dren ucu	4 (1.5)
BAL	3 (1.1)
BOS	3 (1.1)
Plevral mayi	3 (1.1)
CVP Katateri	2 (0.8)
Diyabetik ayak	2 (0.8)
Diğerleri ***	5 (1.9)

\*\*\*: Anaerob, Arter Katateri, Boğaz Sürüntüsü, Kornea, Serviks sürüntüsü.



Şekil 4.2. Klinik örneklerin dağılımı-2

Şuşların izole edildiği materyallere göre tür dağılımı incelendiğinde en sık izole edilen suşlar su şeklindedir; Trakeal aspirasyondan *P. aeruginosa* (n:43) ve *A. baumannii* (n:21); Sürüntü örneğinden *A.baumannii* (n:20) ve *P. aeruginosa* (n:15); Kandan *A.baumannii* (n:18) ve *K. pneumoniae* (n:11); İdrardan *P. aeruginosa* (n:7) ve *P. mirabilis* (n:5); Balgamdan *A. baumannii* (n:5); Abseden *P. mirabilis* (n: 3) ve Dren ucundan *A. baumannii* (n: 4) gibi suşlar izole edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Klinik materyallere göre tür dağılımın (Sayı)

	Bakteri Türü	Sayı
<b>Trakeal aspirasyon (n:85)</b>	<i>A. baumannii</i>	43
	<i>P. aeruginosa</i>	21
	<i>K.pneumoniae</i>	11
	<i>S. maltophila</i>	4
	<i>S. marcescens</i>	2
	<i>P. stuartii</i>	1
	<i>E.cloaceae</i>	1
	<i>E. coli</i>	1
	<i>E. meningoseptica</i>	1
	<b>Sürüntü (n:46)</b>	<i>A.baumannii</i>
<i>P. aeruginosa</i>		15
<i>K. pneumoniae</i>		5
<i>P. mirabilis</i>		3
<i>E. cloaceae</i>		1
<i>E. coli</i>		1
<i>S. maltophila</i>		1
<b>Kan (n:40)</b>	<i>A. baumannii</i>	18
	<i>K. pneumoniae</i>	11
	<i>P. aeruginosa</i>	7
	<i>E. cloacae</i>	3
	<i>E. coli</i>	1
<b>İdrar (n:27)</b>	<i>P. mirabilis</i>	7
	<i>P. aeruginosa</i>	5
	<i>E. coli</i>	4
	<i>A. baumannii</i>	3
	<i>K.pneumoniae</i>	3
	<i>M.morganii</i>	1
	<i>S. maltophila</i>	1
	<i>P. rettgeri</i>	1
	<i>P. stuartii</i>	1
	<i>Proteus spp.</i>	1
<b>Balgam (n:13)</b>	<i>A. baumannii</i>	5
	<i>K. pneumoniae</i>	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2
	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>S. maltophila</i>	1
	<i>S. maltophila</i>	1
	<i>A. xyloxydans</i>	1

Çizelge 4.6. Devamı

<b>Püy (n:8)</b>	<i>A. baumannii</i>	2
	<i>P. mirabilis</i>	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1
	<i>E. coli</i>	1
<b>Abse (n:8)</b>	<i>P. mirabilis</i>	3
	<i>M. morgani</i>	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1
	<i>E. coli</i>	1
	<i>A. baumannii</i>	1
<b>Vajen Sürüntüsü (n:7)</b>	<i>E. coli</i>	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2
	<i>K. oxytoca</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	1
	<i>M. morgani</i>	1
<b>Periton Mayı (n:5)</b>	<i>M. morgani</i>	2
	<i>P. aeruginosa</i>	2
	<i>A. baumannii</i>	1
<b>Dren ucu (n:4)</b>	<i>A. baumannii</i>	4
<b>Plevral Mayı (n:3)</b>	<i>A. baumannii</i>	2
	<i>S. maltophila</i>	1
<b>BOS(Beyin Omurilik Sıvısı) (n:3)</b>	<i>A. baumannii</i>	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1
<b>BAL (n:3)</b>	<i>A. baumannii</i>	2
	<i>P. mirabilis</i>	1
<b>CVP Katateri (n:2)</b>	<i>A. baumannii</i>	2
<b>Diyabetik Ayak (n:2)</b>	<i>M. morgani</i>	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1
<b>Anaerob (n:1)</b>	<i>K. pneumoniae</i>	1
<b>Boğaz Sürüntüsü (n:1)</b>	<i>P. aeruginosa</i>	1
<b>Arter Katateri (n:1)</b>	<i>S. maltophila</i>	1
<b>Kornea (n:1)</b>	<i>B. cepacia</i>	1
<b>Serviks Sürüntüsü (n:1)</b>	<i>E. coli</i>	1

#### 4.5. Antibiyogram Sonuçları

Çalışılan izolatların antibiyogram sonuçlarına göre en yüksek direnç sırasıyla % 94.8 Ampicillin / Sulbactam, % 84.6 Piperacilin ve % 80.0 Tetracycline şeklinde sıralanmıştır (Çizelge 4.7). Antibiyotiklere en yüksek hassasiyet ise %83.8 Colistin, % 49.7 Tigecyclin ve % 46.3 Amikasin şeklinde sıralanmıştır (Çizelge 4.8).

Suşların antibiyogramı Vitek 2 cihazı ile yapılmıştır. Ve bu cihaz için farklı klinik materyallere farklı antibiyogram panelleri kullanılmıştır. Bunlardan idrarda üreyen fermantatif bakteriler (*E.coli*, *K.pneumoniae* vs.) için 266 nolu panel kullanılmıştır. Panellerde kullanılan antibiyotikler çizelge 4.9'da gösterilmiştir. İdrar harici klinik materyallerde üreyen non-fermantatif (*A.baumannii* ve *P.aeruginosa*) bakteriler için 261 nolu panel; idrar ve diğer klinik materyallerde üreyen non-fermantatif GN bakteriler için 262 nolu panel kullanılmıştır (Çizelge 4.9).

Ayrıca suşların bazıları Amikacin, Cefepim, Cefopeazone / Sulbactam, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Tigecycline, Piperacillin, Tetracycline, Gentamicin, Levofloxacin gibi antibiyotiklere orta hassasiyet göstermişti

Çizelge 4.7.Suşların antibiyotiklere direnç oranları (Sayı/%)

Ampicillin / Sulbactam	183(94.8)
Piperacilin	176 (84.6)
Tetracycline	178 (80.0)
Trimethoprim / Sulfamethoxazole	198 (75.9)
Ciprofloxacin	166 (69.4)
Ceftazidim	178 (68.2)
Ceftazidim	178(68.1)
Gentamisin	172 (65.9)
Cefepim	162 (62.0)
Levofloxacin	129 (56.3)
Cefoperazon Sulbactam	111 (51.6)
Amikasin	126 (48.3)
Tigecycline	96 (41.9)
Colistin	38 (15.6)

**Çizelge 4.8.** Suşların antibiyotiklere hassasiyet oranları (Sayı/%)

Colistin	198 (83.8)
Tigecyclin	114 (49.7)
Amikasin	121 (46.3)
Cefoperazone / Sulbactam,	75 (34.8)
Gentamicin	81 (31)
Levofloxacin	59 (25.7)
Ciprofloxacin	59 (24.6)
Trimethoprim / Sulfamethoxazole	63 (24.1)
Ceftazidime	60 (22.9)
Cefepim	46 (17.6)
Tetracycline	28 (10.7)
Piperacillin	19 (9.1)
Ampicillin / Sulbactam	11 (4.2)

**Çizelge 4.9.** Panellerde kullanılan antibiyotikler

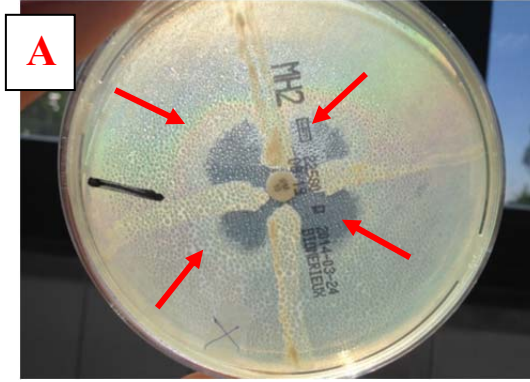
261 nolu panel	262 nolu panel	266 nolu panel
Amikacin	Amikacin	Amikacin
Amoxicillin/clavulanic Acid	Ampicillin/Sulbactam	Amoxicillin/clavulanic Acid
Ampisilin	Cefepime	Ampisilin
Cefepim	Cefoperazone/Sulbactam	Cefepime
Cefoxitin	Ceftazidime	Cefoperazone/Sulbactam
Ceftazidime	Ciprofloxacin	Cefoxitin
Ceftriaxone	Colistin	Ceftazidime
Cefuroxime	Gentamicin	Ceftriaxone
Ciprofloxacin	İmipenem	Cefuroxime
Colistin	Levofloxacin	Ciprofloxacin
Ertapenem	Meropenem	Ertapenem
ESBL	Netilmicin	Fosfomicin
Gentamicin	Piperacillin	Gentamicin
İmipenem	Piperacillin/Tazobactam	İmipenem
Meropenem	Tetracycline	Meropenem
Piperacillin/Tazobactam	Tigecycline	Nitrofurantoin
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Trimethoprim/Sulfamethoxazole

#### 4.6. Metallo-Beta-Laktamaz Enziminin Fenotipik Olarak Tanımlanması

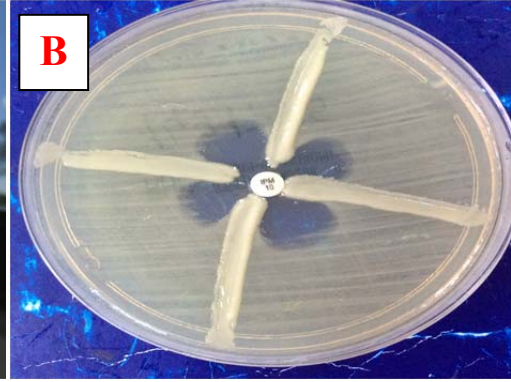
Karbapenemlere dirençli 261 izolatta MBL üretimini belirlemek amacıyla fenotipik olarak MHT, KDD ve ÇDS testleri uygulanmıştır.

##### 4.6.1. Modifiye Hodge Testinin Sonuçları

Karbapenem dirençli 261 izolatın 199'unda (%76.2) MHT ile pozitif sonuç elde edilmiştir. 62'sinde ise (%23.8) negatif sonuç elde edilmiştir. MHT ile pozitif sonuç veren suşların yonca yaprağı görüntüsünden birer örnek şekil 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir. MHT ile pozitif sonuç alınan suşların tür dağılımı çizelge 4.10 ve 4.12'de; pozitif suşların izole edildiği klinik materyaller ise çizelge 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Pozitif MHT örnek-1



Şekil 4.4. Pozitif MHT örnek-2

Çizelge 4.10. MHT pozitif 199 suşun tür dağılımı (sayı/%)

<i>A. baumannii</i>	88 (33.7)
<i>P.aeruginosa</i>	40 (15.3)
<i>K.pneumoniae</i>	32 (13)
<i>P. mirabilis</i>	13 (5.0)
<i>E.coli</i>	9 (3.5)
<i>E. cloacae</i>	5 (2.02)
<i>S. maltophila</i>	5 (2.02)
<i>M. morgani</i>	4 (1.5)
Diğerleri*	3 (1.2)

Çizelge 4.11. MHT ile 199 suşun izole edildiği klinik materyaller (Sayı/%)

Trakeal Aspirasyon	65 (26.3)
Sürüntü	37 (15)
Kan	36 (14.5)
İdrar	16 (6.4)
Abse	7 (2.8)
Balgam	7 (2.8)
Püy	6 (2.4)
Vajen Sürüntüsü	6 (2.4)
BAL	3 (1.2)
BOS	3 (1.2)
Plevral mayi	3 (1.2)
CVP Katateri	2 (0.8)
Dren ucu	2 (0.8)
Periton Mayi	2 (0.8)
Diğerleri**	4(1.5)

Çizelge 4.12. MHT pozitif 199 suşun *Enterobacteriaceae* ve non-*enterobacteriaceae*' ye göre dağılımı

MHT (+) <i>Enterobacteriaceae</i>	Sayı/Yüzde:65/24.9	MHT +Non- enterobacteriae	Sayı/Yü de: 134/51.3
<i>K.pneumoniae</i>	32 (12.2)	<i>A.baumannii</i> ve <i>Acinetobacter spp.</i>	89 (35.44)
<i>P. mirabilis</i>	13 (5.0)	<i>P.aeruginosa</i>	40 (15.3)
<i>E.coli</i>	9 (3.5)	<i>S. maltophila</i>	5 (2.02)
<i>E. cloacae</i>	5 (2.02)		
<i>M. morgani</i>	4 (1.5)		
Diğerleri***	2 (0.76)		

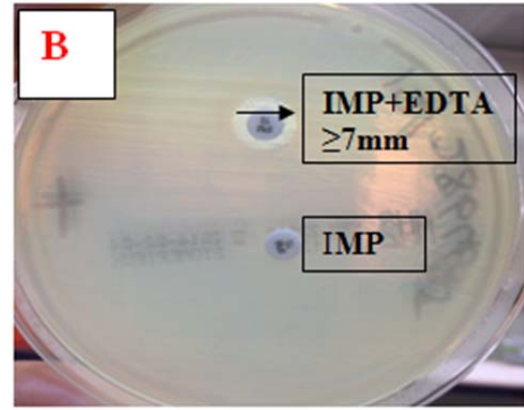
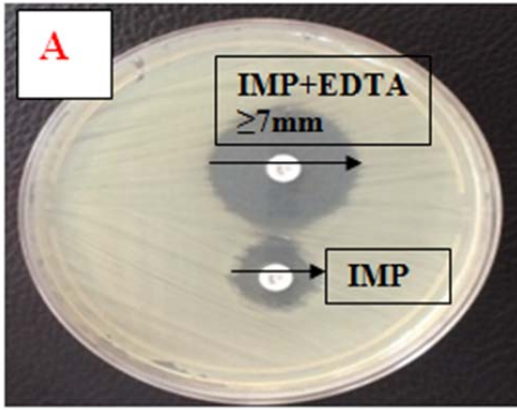
\*: *S.marcescens*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.*

\*\* : Anaerob, Boğaz Sürüntüsü, Diyabetik Ayak Sürüntüsü, Serviks Sürüntüsü.

\*\*\*: *S.marcescens*, *Proteus spp.*,

#### 4.6.2. Kombine Disk Difüzyon Testi

İmipenem ve İmipenem (10µg) + 0.5 M EDTA ile yapılan bu testte, karbepeneme direnç gösteren 261 GN bakteri izolatınının 71'inde (%27.2) MBL enzimi pozitif iken, 190 (% 72.8) suş negatif olarak saptanmıştır. KDD testi ile MBL enzimi pozitif bulunan toplam 71 izolatın IMP ve IPM/EDTA inhibisyon zon çapları arasındaki farklar 7-20 mm arasında değişmekte olup, ortalama fark 11.3 mm olarak bulunmuştur (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7). KDD testi ile en çok MBL pozitif olan izolatlar sırasıyla; *A. baumannii* 39 (%15), *P. aeruginosa* 16 (%6.13)'dır (Çizelge 4.13 ve 4.14). KDD testi ile MBL negatif izolatların inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 1-6 mm arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4.8). MBL negatif izolatlardan bir örnek şekil 4.8'de gösterilmiştir.

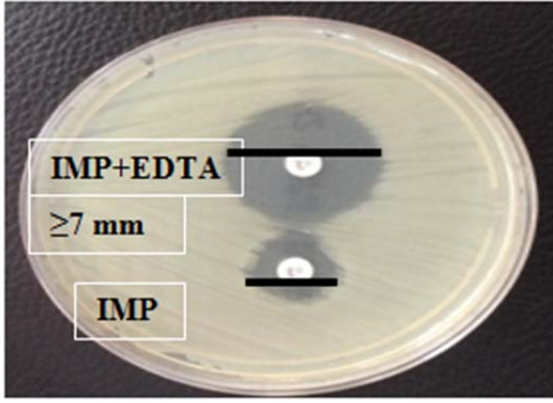


Şekil 4.5. KDD testi pozitif *K.pneumoniae* MBL-1

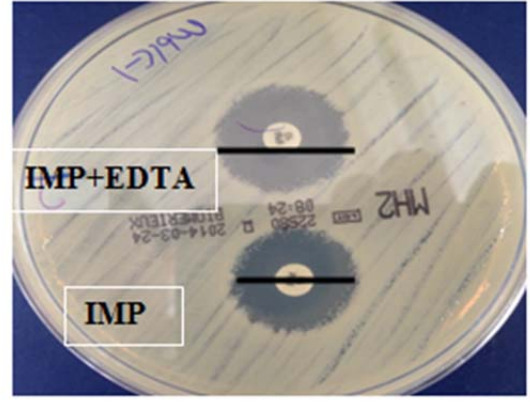
Şekil 4.6. KDD testi pozitif *A.baumannii* MBL-2

Çizelge 4.13. KDD testi ile MBLpozitif 71 suşun dağılımı (sayı/%)

<i>A. baumannii</i>	39 (15)
<i>P.aeruginosa</i>	16 (6.13)
<i>K. pneumoniae</i>	4 (1.5)
<i>S.maltophila</i>	4 (1.5)
<i>E. cloacae</i>	3 (1.14)
<i>P.mirabilis</i>	3 (1.14)
<i>E. coli</i>	1 (0.38)
<i>E. meningoseptica</i>	1 (0.38)



Şekil 4.7. KDD testi pozitif *P.aeruginosa* MBL-3



Şekil 4.8. IMP-EDTA KDD testi negatif suş

Çizelge 4.14. KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun *Enterobacteriaceae* ve non-*enterobacteriaceae*' ye göre dağılımı

<b>KDD + <i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>Sayı/Yüzde:11/4.21</b>	<b>KDD + Non- <i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>Sayı/Yüzde:59/23.0</b>
<i>K. pneumoniae</i>	4 (1.5)	<i>A. baumannii</i>	39 (15)
<i>E. cloacae</i>	3 (1.14)	<i>P.aeruginosa</i>	16 (6.13)
<i>P.mirabilis</i>	3 (1.14)	<i>S.maltophilia</i>	4 (1.5)
<i>E. coli</i>	1 (0.38)	<i>E. meningoseptica</i>	1 (0.38)

KDD testi ile MBL pozitifliği en çok Trakeal aspirasyon (n:29), kan (n:11) ve sürüntü (n:9) örneklerinde saptanmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun izole edildiği klinik materyaller (Sayı/%)

<b><u>Trakeal Aspirasyon</u></b>	<b>29 (11.2)</b>
<b><u>Kan</u></b>	<b>11(4.2)</b>
Sürüntü	9 (3.5)
İdrar	8 (3.06)
Balgam	2 (0.7)
Plevral Mayi	2 (0.7)
Vajen sürüntüsü	2 (0.7)
Diğerleri *(Birer örnek)	8 (2.4)

KDD testi ile MBL üretimi pozitif izolatların servislere göre dağılımı incelendiğinde, en fazla pozitiflik DahiliyeYB (n:17), Reanimasyon (n:12), Yanık ünitesi (n:9) ve Çocuk YB'dan (n:8) geldiği görülmüştür (Çizelge 4.16).

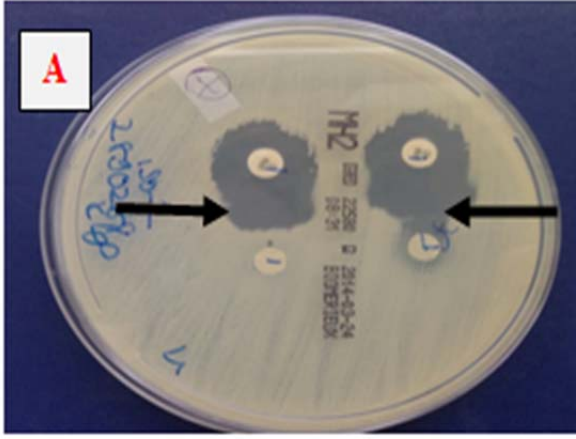
**Çizelge 4.16.** KDD testi ile MBL 71 pozitif suşun servislere göre dağılımı (Sayı)

<b>Dahiliye yoğun bakım</b>	<b>17</b>
<b>Reanimasyon</b>	<b>12</b>
Yanık Ünitesi	9
Çocuk yoğun bakım	8
Beyin Cerrahi Servisi ve YB	3
Diğerleri **	12
Diğerleri ***	10

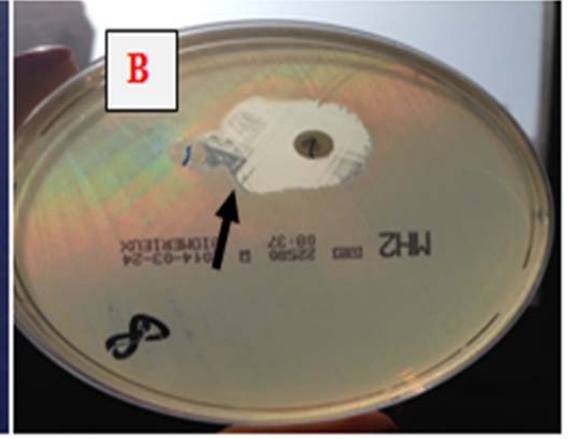
\*: Abse, Arter Katateri, BAL, BOS, CVP Katateri, Dren Ucu, Periton mayi, Püy .  
\*\*: Çocuk sağlığı servisi, Dahiliye hematoloji ve onkoloji servisi, Kadın hastalıkları ve Doğum Polikli., Plastik ve rekonstrüktif cerr. Servis.  
\*\*\*: Çocuk Hematoloji ve Nefroloji Servisi, Çocuk acil tıp ve Yeni doğan YB, Dahiliye nefroloji ve romatoloji ve imm. Ser.,Göğüs hastalıkları ve cerr. Servisi, Klinik bakteriyoloji ve enfeksiyon H ve Nöroloji YB.

#### 4.6.3. Çift Disk Sinerji Testi

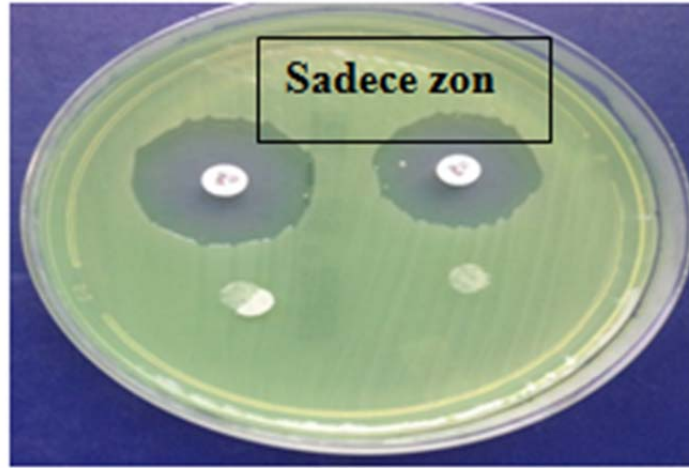
Çalışmaya alınan 261 suşun 37'sinde (% 14.2) IMP diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişleyerek sinerji gösterdiği görüldü ve MBL pozitif olarak kabul edildi (Şekil 4.9 ve 4.10). Suşların 224 (% 85.8)'ünde ise sonuç negatif olarak bulundu (Şekil 4.11). ÇDS testi ile MBL pozitif izolatlar; *P. aeruginosa* 11 suş (%4.2), *E.cloacae* 6 (%2.3) ve *K. pneumoniae* 5 (%1.9) olarak sıralanmaktadır (Çizelge 4.17 ve 4.18).



Şekil 4.9. ÇDS testi pozitif MBL -1



Şekil 4.10. ÇDS testi pozitif MBL-2



Şekil 4.11. ÇDS testi negatif

Çizelge 4.17. ÇDS testi ile MBL 37 pozitif suşun tür dağılımı (Sayı/%)

<i>P. aeruginosa</i>	11 (4.2)
<i>E. cloacae</i>	6 (2.3)
<i>K. pneumoniae</i>	5 (2.0)
<i>E. coli</i>	4 (1.5)
<i>A. baumannii</i>	3 (1.1)
<i>P. mirabilis</i>	2 (0.8)
<i>S.maltophila</i>	2 (0.8)
Diğerleri *	4 (1.2)

\*: *B.cepacia*, *E. Meningoseptica*, *S. Marcescens*, *Proteus spp.*,

**Çizelge 4.18.** ÇDS testi ile MBL pozitif 37 suşun *Enterobacteriaceae* ve *non-enterobacteriaceae*'ye göre dağılımı

ÇDS (+) <i>Enterobacteriaceae</i>	Sayı/Yüzde:19/7,27	ÇDS (+) <i>Non-enterobacteriaceae</i>	Sayı/Yüzde:18/6.85
<i>E. cloacae</i>	6 (2.3)	<i>P. aeruginosa</i>	11 (4.2)
<i>K. pneumoniae</i>	5 (2.0)	<i>A. baumannii</i>	3 (1.1)
<i>E. coli</i>	4 (1.5)	<i>S.maltophilia</i>	2 (0.8)
<i>P. mirabilis</i>	2 (0.8)	Diğerleri**	3(1.2)
Diğerleri*	2(0.76)		

\*: *S. marcescens*, *Proteus spp.*

\*\* : *E. meningoseptica*, *B.cepacia*.

ÇDS testi ile MBL pozitif olan suşların en sık izole edildiği klinik materyal sırası ile trakeal aspirasyon 12 (%4.5), kan 8 (%3.06) ve idrar ise 7 (%2.6) izolat olarak sıralanmıştır (Çizelge 4.19).

**Çizelge 4.19.** ÇDS testi ile MBL pozitif 37 suşun klinik örneklerle göre dağılımı (Sayı/%)

<b>Trakeal aspirasyon</b>	<b>12 (4.5)</b>
<b>Kan</b>	<b>8 (3.06)</b>
İdrar	7 (2.6)
Abse	2 (0.7)
BOS	2 (0.7)
Diğerleri ***	6 (1.8)

\*\*\*: Balgam, boğaz sürüntüsü, kornea, periton mayi, yanık sürüntüsü, vajen sürüntü.

ÇDS testi ile MBL izolatlar en sık yanık ünitesinden 5, çocuk yenidoğan servisi den 4 ve bunu 3'er örnek ile çocuk YB, dahiliye onkoloji, genel cerrahi YB ve reanimasyon izlemiştir. (Çizelge 4.20).

**Çizelge 4.20.** ÇDS Testi ile MBL 37 pozitif suşun servislere göre dağılımı (sayı)

<b>Yanık Ünitesi</b>	<b>5</b>
<b>Çocuk Yenidoğan Servisi ve YB</b>	<b>4</b>
Çocuk YB	3
Dahiliye Onkoloji Servisi	3
Genel Cerrahi YB	3
Reanimasyon	3
Dahiliye YB	2
Diğerleri *	14

\*: Beyin cerrahi YB, Plastik ve Rekonstrüktif Cerr. Servis, Göğüs H. Servisi, Çocuk sağlığı ser., Çocuk hematoloji servisi ve alerji-immunoloji poliklinik, Çocuk enfeksiyon ser., Dahiliye hematoloji ve nefroloji servisi, Göz hastalıkları ser., Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H, Kadın hastalıkları ve Doğum Polik., Koroner YB, Nöroloji YB, Üroloji YB.

#### **4.6.4. Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Difüzyon Testi ve Çift Disk Sinerji Test Sonuçları ve Uyumları**

MHT ile 261 izolatın 199'unda, KDD testi ile 71'inde, ÇDS testi ile 37'sinde MBL pozitifliği saptandı. (Çizelge 4.21).

**Çizelge 4.21.** MHT, KDD Testi ve ÇDS Test Sonuçları

Testler	MHT	KDD	ÇDS
<b>Pozitif</b>	<b>199</b>	<b>71</b>	<b>37</b>
Negatif	62	190	224

KDD ile ÇDS testlerinin birbirleriyle uyumu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

KDD testi ile ÇDS testinin uyum oranı şu şekildedir:

Uyum (%):  $a+b/c \times 100$

a: Her iki test ile pozitif sonuç veren suş sayısı: 13

b: Her iki test ile negatif sonuç veren suş sayısı: 166

c: Toplam izolat sayısı: 261

d: KDD (+) ÇDS(-): 58

e: ÇDS (+) KDD(-): 24

Buna göre; IMP/EDTA KDD ile ÇDS testi birbirleriyle % **68,5** oranında uyumlu bulunmuştur.

MHT ile KDD testinin uyum oranı şu şekildedir:

Uyum (%):  $a+b/c \times 100$

a: Her iki test ile pozitif sonuç veren suş sayısı: 56

b: Her iki test ile negatif sonuç veren suş sayısı: 47

c: Toplam izolat sayısı: 261

d: MHT (+) KDD (-): 143

e: KDD (+) MHT(-): 15

Buna göre MHT testi ile KDD testini uyum oranı % **39.4'** dür.

MHT testi ile ÇDS testinin uyum oranı şu şekildedir:

Uyum (%):  $a+b/c \times 100$

a: Her iki test ile pozitif sonuç veren suş sayısı: 24

b: Her iki test ile negatif sonuç veren suş sayısı: 49

c: Toplam izolat sayısı: 247

d: MHT(+) ÇDS(-): 175

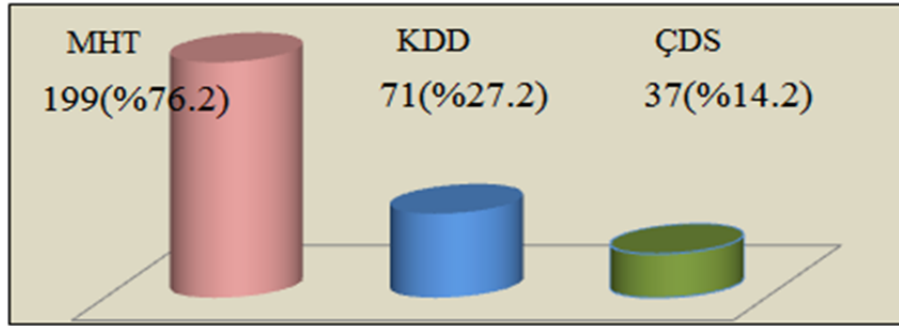
e: ÇDS(+) MHT(-): 13

MHT testi ile ÇDS testinin uyum oranı % **27.9** dur.

**Çizelge 4.22.** Fenotipik Testlerin uyum oranı (%)

MHT- KDD	39.4
MHT- ÇDS	27.9
KDD- ÇDS	68.5

MHT'nin sonuçları, KDD ve ÇDS testinden oldukça farklı sonuçlar vermiştir (Şekil 4.12). MHT ile 199 (%76.2) izolatta MBL pozitifliği belirlenmiş ve bu test değerlendirilmesi sırasında test sonuçlarının güvenilirliği sorgulanmış, yalancı pozitif sonuç veren suşların olabileceği düşünülmüş ve MBL üreten suşlar KDD ve ÇDS test sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.12. Fenotipik testlerin pozitif sonuçları (Sayı/%)

Her üç testle de MBL pozitif suş sayısı 9 (%3.4), negatif izolat sayısı 38'(%14.5) dir. Her üç testle de pozitif izolatların tür dağılımı, örneğin izole edildiği klinik materyal ve geldiği servislerin dağılımı çizelge 23'de gösterilmiştir. Fenotipik testlerin birbirleri ile uyum oranı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarındaki uyumun olmadığı bulunmuştur (ki-kare, kappa değeri <0.20, p<0.001).

Çizelge 4.23. MHT, KDD ve ÇDS testi pozitif 9 suşun servislere, klinik materyale, dirençli olduğu karbapenem grubuna ve türe göre dağılımı

Klinik Materyalin Geldiği Servis	Klinik Materyal	Dirençli Antibiyotik	MBL Pozitif Suş
Beyin Cerrahi YB	İdrar	İmp,Mem	<i>P.aeruginosa</i>
Dahiliye Hematoloji Servisi	Kan	İmp,Mem	<i>P.aeruginosa</i>
Dahiliye Onkoloji Servisi	BOS	İmp,Mem,Ert	<i>K. pneumoniae</i>
Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon	İmp,Mem	<i>P. aeruginosa</i>
Yanık Ünitesi	Kan	İmp,Mem	<i>K. pneumoniae</i>
Yanık Ünitesi	Kan	İmp,Mem,Ert	<i>K. pneumoniae</i>
Yanık Ünitesi	Kan	İmp,Mem	<i>E. cloacae</i>
Yanık Ünitesi	Kan	İmp,Mem	<i>E.cloacae</i>
Yanık Ünitesi	Sürüntü	İmp,Mem	<i>E. cloacae</i>

MBL (+) suşlarına karbapenem grubundaki antibiyotiklerin direnç oranlarının etkileri karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (ki-kare, kappa değeri <0.20, p<0.001). İstatistik sonuçlarına göre üç testin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif kestirim değerleri çizelge 4.24’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.24.** Fenotipik Testlerin istatistik sonuçları

<b>Altın Standart Test</b>	<b>Referans Test</b>	<b>Duyarlılık (%95CI)</b>	<b>Özgüllük (%95CI)</b>	<b>Pozitif Kestirim Değeri (%95CI)</b>	<b>Negatif Kestirim Değeri (%95CI)</b>
Kombine Disk Difüzyon	Modifiye Hodge	78.87	24.74	28.14	75.81
	Çift Disk Sinerji	18.31	87.37	35.14	74.11
Çift Disk Sinerji	Modifiye Hodge	64.86	21.88	12.06	79.03
	Kombine Disk Difüzyon	35.14	74.11	18.31	87.37
Modifiye Hodge	Kombine Disk Difüzyon	28.14	75.81	78.87	24.74
	Çift Disk Sinerji	12.06	79.03	64.86	21.88

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. GN bakteriler, hem toplum hem hastane kökenli enfeksiyonların önemli nedenlerindedir. ÇİD gösteren *Salmonella* ve *Shigella* türleri toplum kökenli enfeksiyonlara; ÇİD olan *E. coli*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Stenotrophomonas* türleri ise daha çok hastane kökenli enfeksiyonlara yol açmaktadır<sup>144</sup>. Hastanelerde antibiyotik kullanımının yaygın ve kontrolsüz olması nedeniyle kullanılan antibiyotiklere karşı direnç önemli bir sorun haline gelmiştir<sup>145</sup>.

HE etkeni olan GN bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirmesinde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir<sup>146</sup>. Beta laktam grubu antibiyotiklerin en geniş spektrumlu olan karbapenemlere de direnç gelişmektedir. Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalarla direnç gelişebilmektedir<sup>147</sup>. Bakteri dış membran proteinlerinde değişiklik sonucu geçirgenliğin azalması, karbapenemin dışarı pompalanması, AmpC tipi beta-laktamazların aşırı üretimi, karbapenemaz üretimi enfeksiyonlara tedavi sırasında imipenem direnç geliştirebilir<sup>148</sup>.

Dünyanın değişik bölgelerinden farklı direnç oranları bildirilmektedir. MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) çalışmasının 2007 verilerinde HE etkeni *P. aeruginosa*'da direnç oranları imipenem için % 30,2, meropenem %14,8, seftazidim % 26,1, piperasilin-tazobaktam için %19,6, siprofloksasin %23,2, gentamisin %37,7 ve tobramisin %25,8; *Acinetobacter spp*'de meropenem için %12, imipenem %12,6, seftazidim %47, piperasilin-tazobaktam %38,5, siprofloksasin %51,2, gentamisin %41,5 tobramisin %26,7 olarak bildirilmiştir<sup>149</sup>.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) 2011 yılı verileri karşılaştırıldığında *P.aeruginosa* izolatlarının direnç oranları piperacillin/tazobactam için %2,8, seftazidim için %8,2, karbapenemler için %12, siprofloksasin için %12,6, gentamisin için % 6,5 ve ÇİD için % 4 olarak rapor edilmiştir<sup>150</sup>.

Kaur ve ark.'nın 964 *A.baumannii* izolatu ile ilgili çalışmasında direnç oranları imipenem %40.3, amikasin %64.9, gentamisin %88.1, siprofloksasin %88, seftazidim %89.5, sefepim %86.9, piperasilin-tazobaktam %28.9 olarak bulmuşlardır<sup>151</sup>. Karthika ve ark. MBL prevanlansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada meropenem direncini %44 olarak bulmuşlardır<sup>152</sup>. Ülkemizde imipenem direnci *P.aeruginosa*'da ve *Acinetobacter spp.* farklılıklar göstermekte olup, *P.aeruginosa*'da %4 ile %88, *Acinetobacter spp.*'de %8,8 ile %74 arasında değişmekte olup, seftazidim için bu oran sırası ile *P.aeruginosa*'da %17,7 ile %73 ve *Acinetobacter spp.*'de %38 ile %81 arasında görülmektedir<sup>153,154,155,156,157</sup>.

Çalışmamızda, 261 karbapenem dirençli suşun 236'sı (% 90.4) imipeneme 194'ü (%74.3) meropeneme, ertapenemin kullanıldığı panellerde 89 suşun 41'i (%46.06) ertapeneme dirençli olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ayrıca izolatların sefepim, seftazidim ve piperasiline direnç oranları sırasıyla % 62.0, % 68.2 ve % 84.6 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda amikasin, gentamisin ve ampisilin/sulbaktam direnç oranları sırasıyla; % 48.3, % 65.9, % 94.8 olarak bulunmuştur. Ampisilin/sulbaktam direncinin yüksek olması dikkati çekmektedir. Çalışmamızda kolistin direnci % 16.2 tigesiklin direnci % 41.9, siprofloksasin direnç oranı % 69.4 dir. Kolistin direncinin düşük olması hastanemizdeki enfeksiyonların tedavisinde alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın imipenem, meropenem, seftazidim, siprofloksasin ve gentamisin sonuçları MYSTIC verileriyle kıyaslandığında yüksek oranda olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çalışma konusunun karbapenem gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere dirençli suşların seçilmesi ve bunların bir çok beta-laktam grubu ve diğer antibiyotiklere dirençli olması ve izole edilen suşların dahiliye YB ve genel cerrahi YB, reanimasyon ve yanık gibi hayati önem taşıyan servislerden gelen örneklerden izole edilen suşlar olmasından kaynaklandığı şeklinde açıklanabilir. Ayrıca direnç paternlerindeki farklılık, antibiyotik kullanım politikalarına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir.

Karbapenemlere karşı direnç sıklıkla gelişmekle birlikte; MBL'lerle ilişkili direnç, karbapenemlerin yanı sıra birçok beta-laktam antibiyotiğe karşı direnç gelişimine de sebep olmaları ve bakteriler arasında hızla yayılabilmeleri nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Karbapenem direncinden sorumlu mekanizmalar arasında

MBL enzimleri birinci sırada olmamakla birlikte aktarılabılır genlerle kodlandıklarından hızlı bir yayılım göstermektedir<sup>158</sup>. MBL'ler genel olarak *P.aeruginosa* suşlarında saptanmakla birlikte, *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia*, *B. fragilis*, *Serratia spp.*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii* gibi GN bakterilerden de izole edilmektedir<sup>159</sup>.

Plazmidik MBL'ler son birkaç yılda dünya genelinde hızlanan yayılmaları ile gündemde yer tutmaktadır<sup>83</sup>. Özellikle, NFGN'lerde IMP veya VIM tipi MBL'lerin yayılması iki nedenle epidemiyolojik risk oluşturur. Birincisi, MBL'ler sadece karbapenemlere değil tüm beta-laktamlara direnç oluşturabilir ve beraberinde taşınabilen diğer direnç genleriyle aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı da ÇİD gösterebilirler. İkincisi, IMP veya VIM tipi enzimleri kodlayan genler sıklıkla mobil genetik elemanların (integronlar) üzerinde taşındıklarından farklı suşlar arasında horizontal olarak yayılabilirler<sup>160</sup>.

MHT, IMP/EDTA KDD testi, IMP-EDTA ÇDS, MBL E-Test MBL'nin belirlenmesinde kullanılan basit tarama testleridir. MBL enzim tayini için PZR gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Duyarlılık ve özgüllük oranı yüksek olsa da, bugün için sayıları artmış olan MBL subtiplerini PZR ile saptamak etkili olmamaktadır<sup>83,143 161</sup>.

Modifiye Hodge testini geliştiren Lee ve ark. nın PZR ile blaVIM-2 geni pozitif bulunmuş olan *P. aeruginosa* izolatında MHT'ni % 100 duyarlı ve % 88 özgüllükte bulmuş<sup>141</sup>, 2003 yılındaki çalışmalarında ise blaIMP-1 veya blaVIM-2 geni pozitif 39 *P. aeruginosa* izolatında MHT'nin performansını değerlendirmiş ve 26 pozitif, 10 şüpheli ve 3 negatif sonuç elde etmişler ve testin duyarlılığında düşme görmüşlerdir<sup>162</sup>. Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada, MHT ile imipenem dirençli 530 kökünde *Acinetobacter spp.* için % 1.6, *Pseudomonas spp.* için % 6.4 pozitiflik saptamışlardır<sup>163</sup>. MHT için aynı araştırmacıların farklı bulguları ve yöntemi tekrar modifiye etme çalışmaları nedeniyle *P. aeruginosa* suşlarında testin güvenilirliği tartışmalıdır. MHT ile ilgili olarak dünyada yapılan diğer çalışmalardan Jesudason ve ark. imipenem dirençli GN bakterilerin %56'sında MHT ile MBL üretimi saptamışlardır. Ayrıca bu testin basit bir test olmakla birlikte besiyerine çinko ilavesiyle daha etkili olabileceğini belirtmişlerdir<sup>164</sup>.

Oh ve ark. MHT'nin MBL üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alınabildiğini ve MHT duyarlılığını yükseltmek amacıyla besiyerine çinkosülfat ilave edilerek zenginleştirilebileceğini vurgulamıştır<sup>165</sup>.

Yurd dışında MHT ile ilgili çalışmalar *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*'de %14-100 arasında MBL pozitif sonuçlar elde edilmiştir<sup>93,116,129,164,167,168</sup>. Nepal'de yapılan bir çalışma'da imipenem ve meropenem dirençli 216 *E.coli* suşunun 41'i(%18.98) ve 185 *K.peumoniae* suşunun 392u 8%21.08) MHT ile MBL pozitif bulunmuştur<sup>170</sup>.

Ülkemizde MHT'nin uygulandığı *A.baumannii* ile ilgili olarak; %43.6-80 arasında MBL pozitif olarak bulunmuştur<sup>14,166,169,175,176,177,197</sup>. MHT'ne ilişkin ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda *Pseudomonas spp.* için MBL pozitiflik oranı %1.4-74 arasında değişen oranlarda MBL pozitif sonuç bulunmuştur<sup>14,161,169,171,172,173,176,195,197</sup>. Ülkemizde MHT ile hiç MBL enzim pozitifliği bulunmayan çalışmalarda vardır<sup>166,172,174,179,191</sup>.

Çalışmamızda MHT ile karbapenem dirençli 261 suşun, 199'u (%76.2) pozitif, 62'si (%23.8) negatif sonuç vermiştir. MHT, karbapenemaz aktivitesini GN bakterilerde test etmek için CLSI tarafından önerilen fenotipik yöntemdir. Karbapenemaz enzimlerinin varlığını gösteren MHT'nin pozitif bulunması, kökenlerin diğer karbapenemaz enzimlerini (MBL, KPC, OXA) ve diğer direnç genlerini de taşıdığını düşündürmektedir. Ayrıca bu testin zayıf karbapenemaz üreten bakterilerde yorumlanması güç olabilir. MHT kolay uygulanılabilen bir testtir ve yöntemin karbapenemaz üretimini test etmede duyarlılığı yüksektir ancak tek başına kullanıldığında karbapenemazların ayırımını yapamadığından özgüllüğü düşüktür<sup>171,174</sup>.

Çalışmamızda kullandığımız ikinci fenotipik yöntem KDD testtir. Bununla ilgili olarak Yong ve ark. PZR ile *blaIMP-1* veya *blaVIM-2* geni pozitif bulunan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatında IMP/EDTA KDD testini çalışmış, testin duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla, % 95.7 ve % 91 olarak bildirmişler, aynı araştırmacı *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.*'de MBL enzimi ürettiğini göstererek, bu testin rutin laboratuvarlarda MBL taranmasında kullanılabilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir<sup>143</sup>. Yan ve ark. KDD testi ile imipenem dirençli *P. aeruginosa*'da %86.7 oranında MBL pozitifliği saptamış ve testin duyarlılığını %70 olarak belirtmişlerdir<sup>139</sup>.

Samuelson ve ark. karbapenemlere dirençli 60 *P. aeruginosa* izolatında ve MBL pozitif kontrol suşlarında KDD testini çalışmışlardır. 60 *P. aeruginosa* suşunun ikisi genotipik olarak MBL pozitif bulunmuş, bu iki suş ve pozitif kontrol amaçlı çalışılan yedi suş KDD testi ile pozitif sonuç vermiştir. Bu çalışma için testin duyarlılığı % 86, özgüllüğü % 91 olarak saptanmıştır<sup>180</sup>.

Pakistan'da ÇİD ve imipenem dirençli 90 *A. baumannii* suşunun 83'ü (%96.6); ÇİD ve imipenem dirençli 25 *P. aeruginosa* suşunun hepsi (%100) KDD testiyle MBL pozitif bulunmuş ve bu sonucun fazla karbapenem kullanımının bir sonucu olduğunu belirtmişlerdir<sup>181</sup>. Hindistan'da yapılan çalışmalarda MBL oranları *P.aeruginosa* 'da KDD testi ile %11.1 ve %69.8; *Acinetobacter spp.* %41.3 olarak bulunmuştur<sup>182,183</sup>. Araştırmacılar MBL üretiminin hızla yayılmasının endişe verici olduğunu ve karbapenemlerin doğru uygulanmasının gerektirdiğini belirtmişlerdir<sup>182</sup>.

Türkiye'de KDD ile çalışmalarda MBL sıklığı; *Pseudomonas spp.* için %8-100 gibi değişen oranlarda görülmüştür<sup>14,158,161,166,169,174,184,185,186, 187, 191,193,195,197</sup>. Ülkemizde KDD ile yapılan çalışmalarda *Acinetobacter spp.* için %29.1-100 arasında değişen oranlarda MBL görülmüştür<sup>14,166,169,175,177,184,187,188,197,198</sup>.

Çakar ve ark. *Pseudomonas spp.*'de MBL'nin tayininde beş fenotipik yöntem uygulanmış ve sonuçlar PCR ile karşılaştırılmıştır. Fenotipik testlerin MBL tayininde yeterli olmadığı görülmekle birlikte, PCR sonucu ile en uyumlu testin KDD testi olduğunu bildirmişlerdir<sup>189</sup>.

Cesur ve ark. Türkiye' de 7 farklı coğrafi bölgeyi temsil eden 8 ilden (Ankara, Konya, Antalya, İstanbul, İzmir, Diyarbakır, Van ve Trabzon) toplam 186 karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* kökeninde MBL'nin varlığı KDD testi ile araştırmışlar. Suşların ortalama %31,2'sinde MBL enzimi pozitifliği saptanmıştır. MBL pozitiflik açısından en yüksek iller Antalya (%52), İstanbul (%50), en düşük Diyarbakır (%6) olarak bulunmuştur<sup>190</sup>.

IMP-0.5M EDTA ile yapmış olduğumuz çalışmamızda KDD yöntemi ile 261 suşun 71'inde (%27.2) MBL pozitif olarak bulunmuş ve bu test ile pozitif sonuç veren izolatlar sırasıyla *A. baumannii* (n:39), *P. aeruginosa* (n:16), *K. Pneumoniae* (n:4), *S.maltophilia* (n:4), *E.cloacae* ve *P.mirabilis* 3, *E.coli* ve *E. meningoseptica*'dan birer örnek MBL pozitifdir. Çalışmamızdaki *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatları için MBL oranı, Türkiye'deki verilerle kıyaslandığında düşük olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda yapılan diğer test ise ÇDS testidir. Bu test ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Lee ve ark. VIM geni enzim ürettiği önceden saptanmış olan *P.aeruginosa*'da IMP-EDTA kullanılarak yapılan ÇDS testinin %100 özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu rapor etmişlerdir<sup>141</sup>. Aynı araştırmacı, 530 suş ile yaptıkları başka bir çalışmada *Pseudomonas spp*'de %9.8, *Acinetobacter spp.*'de %2,5 oranında bu yöntem ile MBL varlığını saptamıştır<sup>163</sup>.

Jesudason ve ark., imipeneme dirençli 50 GN bakteri ile yaptıkları çalışmada ÇDS testi ile 36 suшта MBL üretimi saptamış ve bu testin MHT'inden daha üstün olduğunu vurgulamışlardır<sup>164</sup>.

Ülkemizde ÇDS testi ile MBL tarama çalışmalarında *Pseudomonas spp.* için şu sonuçlar çıkmıştır: Çakar ve ark. 110 *P.aeruginosa* izolatının 22'si (%20)<sup>189</sup>, Dinç ve ark. 35 *P.aeruginosa* izolatının 6'sını (%11.4) pozitif olarak bulmuşlardır ve Dinç ve ark. testin duyarlılığını %100, özgüllüğü ise %96 olduğunu bildirmişlerdir<sup>158</sup>.

Türkiye'de yapılan ÇDS ile yapılan diğer çalışmalarda *Pseudomonas spp.* için MBL %5 ile %100 arasında değişmektedir<sup>158,166,169,173,174,176,189,191,196,197</sup>. Güçlü ve ark. ise imipenem dirençli 58 *P. aeruginosa* izolatında ÇDS yöntemiyle hiçbir izolatta MBL enzimine rastlamamışlardır<sup>179</sup>. Ülkemizde *Acinetobacter spp.* ile ilgili yapılan ÇDS testi çalışmalarında % 45.7-87 arasında MBL pozitifliği bulunmuştur<sup>166, 169,175,176,197</sup>.

Çalışmamızda ÇDS testinde 261 suşun 37'sinde (%14.2) MBL enzimi bulunmuştur ve bu test ile pozitif sonuç veren izolatlar *P.aeruginosa* (n:11), *E.cloacae* (n:6), *K. pneumoniae* (n:5), *E. coli* (n:4), *A.baumannii* (n:3), *P.mirabilis* ve *S.maltophila* (n: 2) ve *B.cepacia*, *E.meningoseptica*, *S.marcescens* ve *Proteus spp.*'den birer örnek MBL pozitifdir.

Migliavacca ve ark. MBL enzim üretiminin saptanması için kullanılacak besi yerleri ve inhibitör maddeleri karşılaştırılmış; Mueller Hinton Agar en uygun besiyeri, EDTA ise en başarılı inhibitör madde olarak bildirilmiştir<sup>195</sup>.

Çalışmamızda, MBL enziminin üretimini göstermek için yapmış olduğumuz fenotipik testlerde toksik ve uçucu olmaması ve kolay uygulanması nedeniyle şelatör olarak EDTA ve besi yeri olarak CLSI'nin önerdiği üzere Mueller Hinton kullanılmıştır.

KDD testi ile yapılan testte ÇDS testine göre daha fazla izolat MBL pozitif sonuç vermiştir. MBL enzimlerinin araştırılması ve değerlendirilmesi ÇDST'ne göre

daha objektif olan KDD yönteminin sıklıkla kullanılan fenotipik bir yöntem olabileceği düşünülmüştür.

ÇDS testinin değerlendirilmesindeki kriter, imipenem inhibisyon zonunun EDTA'ya doğru genişlediğinin gözlenmesidir. Bu durum subjektiftir. Sinerji oluşumunun; Çevresel faktörlere, testin uygulandığı laboratuvara, testi yorumlayan kişiye ve çalışmanın uygulandığı bölgedeki kökenlerin direnç özelliklerine göre değişebileceği düşünülmüştür. ÇDS testinde yanlış pozitif sonuç elde edilmesinin en önemli nedeni, metal şelatör olarak kullanılan EDTA ya da 2-MPA'in tek başına da özgül olmayan geniş inhibisyon zonu oluşturabilmesidir.

Fenotipik testlerle elde edilen sonuçların daha önce yapılan çalışmalarla farklı olduğu görülmüş bunun sebebinin çalışılan örnek sayısına, kullanılan EDTA miktarına, araştırmacıya ve çalışmanın uygulandığı bölgedeki kökenlerin direnç özelliklerine göre farklılık göstermekte olduğu görülmektedir. Çalışmamızda birkaç hastanın Suriye ve Irak kökenli olduğu görülmüş ve bu hastalardan belirli zaman aralığında aynı ya da farklı bölgeden tekrar klinik örnek alındığı belirlenmiştir. Ve bu hastalardan farklı suş üremiş ve MBL üretimi görülmüştür. MBL pozitifliği gözlemlenen bu hastalarda ayrıca ÇİD'de görülmüştür. Bu sonucun nedeninin uzun süre hastanede yatma, fazla antibiyotik kullanımı, hastaların farklı bölgeden olması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda fenotipik yöntemlerdeki MBL üretiminin oranı, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında testler arasında uyumun olmadığı görülmüştür ( $p<0.001$ ).

Çalışmamızda, MBL pozitifliğinin en fazla YB ünitelerinden gönderilmiş olan trakeal aspirat, kan, idrar ve sürüntü örneklerinden izole edilen suşlarda olması, bu birimlerin dirençli bakterilerle enfeksiyonlar açısından en riskli birimler olmaları gerçeği ile örtüşmekle birlikte, özellikle hastanelerin bu birimlerinden izole edilen enfeksiyon etkenlerinde bu gibi aktarılabılır direnç özelliklerinin takibinin önemi dikkatimizi çekmiştir.

Henüz CLSI'da MBL üretimini saptamak için önerilen standart bir yöntem bulunmamaktadır. MBL tespiti için fenotipik testler ile tarama yöntemleri ile kesin sonuç elde etmek henüz mümkün değildir. Kullanılan yöntemlerin hiçbirisinin tek başına yeterli olmadığı bildirilmektedir. Her yöntemin kullanım kolaylığı, duyarlılığı ve özgüllüğü açısından avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır<sup>180,183</sup>. Bu nedenle

fenotipik yöntemlerle saptanan MBL pozitif kökenlerin moleküler yöntemlerle uygulanmalı ve suşlardaki gen-enzim varlığı doğrulanmalıdır.

Çalışmamızda direnç genlerinin gösterilememiş olması nedeniyle fenotipik testlerden hangisinin daha anlamlı olduğuna dair bir sonuca ulaşamamıştır. Bu sebeple fenotipik yöntemlerle saptanan MBL pozitif kökenlerin moleküler yöntemlerle doğrulandığı ileri çalışmalara gereksinim vardır ve daha sonraki zamanlarda suşlarımız MBL açısından Tıbbi Mikrobiyoloji ABD’de moleküler yöntemlerle doğrulanacak ve MBL gen varlığı net bir şekilde ortaya konulabilecektir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karbapenemlere direnç gösteren GN bakterilerde MBL enzim üretimi fenotipik yöntemlerle araştırdığımız çalışmamızın sonucunda;

1. Çalışma kapsamına karbapeneme direnç gösteren 261 Gram negatif bakteri alınmıştır. Karbapeneme en fazla direnç gösteren suşlar; *A.baumannii* (%39.8), *P. aeruginosa* (%22.2) ve *K. pneumoniae* (%14.2)'dir.
2. Suşların %90.4'ü imipenem, %74.3'ü meropenem ve % 46.6'sı ertapeneme dirençli bulunmuştur. En düşük direnç kolistin'de (%16) olduğu görülmüştür. Bu durum MBL pozitif olguların tedavisinde önemli bir alternatif olabileceğini göstermiştir.
3. Karbapenemlere dirençli suşların ve MBL pozitif izolatların çoğunluğu Reanimasyon, Dahiliye YB, Yanık ünitesi gibi yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Yoğun bakım üniteleri hastanenin diğer servislerine göre *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* enfeksiyonları açısından daha riskli durumdadır. Bu nedenle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon kontrol önlemlerinin eksiksiz uygulanması, antibiyotik direnç profilinin sürekli izlenmesi ve doğru antibiyotik kullanım politikalarının oluşturulması gerekmektedir
4. MBL pozitifliğin en fazla yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş olan trakeal aspirat, kan kültürü, idrar ve sürüntü gibi örneklerden izole edilmiştir
5. MHT ile karbapenem dirençli 261 suşun, 199'u (%76.2) pozitif, 62'si (%23.8) negatif olarak elde edilmiştir. MHT ile en çok MBL üreten suşlar *A.baumannii* (n:88), *P.aeruginosa* (n:40) ve *K.pneumoniae* (n:32)'de saptandı.
6. KDD ile 261 suşun 71'i (%27.2) MBL pozitif, 190'ı (%72.8) negatif olarak saptanmıştır. KDD testi ile fazla MBL üreten suşlar; *A.baumannii* (n:39) ve *P.aeruginosa* (n:16)'dir.
7. ÇDS testinde 261 suşun 37'si (%14.2) MBL enzimi pozitif, 224 'ü (%85.8) negatiftir ve bu test ile en çok sık pozitif olan izolatlar *P. aeruginosa* (n:11) ve *E.cloacae* (n:6)'dir.

8. Karbapenemlere dirençli izolatlarda MBL üretimini belirlemek için kullandığımız yöntemlerden MHT'nin, diğer iki yönteme göre fazla pozitif sonuç alınması ve fazla oranda yalancı pozitif ihtimalini düşündürmesi nedeniyle, rutin laboratuvarımızda MBL tarama testi olarak kullanılması uygun görülmemektedir ve başka bir yöntem daha uygulanarak doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.
9. Uygulanan testler arasındaki uyum şu şekildedir: MHT ile KDD % 39.4, MHT ile ÇDS testi % 27.9, KDD ile ÇDS % 68'dir.
10. Çalışmamızda direnç genlerinin gösterilememiş olması nedeniyle fenotipik testlerden hangisinin daha uygun bir test olduğuna dair bir sonuca ulaşamamış fakat daha sonraki zamanlarda suşlarımız MBL açısından Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD'de moleküler yöntemlerle doğrulanacak ve MBL gen varlığının net bir şekilde ortaya konulmasına çalışılacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Dilek N.** Enfeksiyon kapan hastanelere neşter. *Aksiyon Haftalık Haber Dergisi* (Electronic journal), **2005**; 10 (570): 1 – 5.
2. **Çağlar K.** Hastane infeksiyonları. *Galenos Dergisi*, **2002**; 6 (74): 20 – 25.
3. **Kaleli İ.** Hastane infeksiyonları. *Galenos Dergisi*, **2003**; 7 (83): 17- 22.
4. **Akalın HE, Kanra, G.** Hastane İnfeksiyonları, 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **1993**.
5. **Baron EJ, Finegold SM.** Diagnostic Microbiology. 7th. Ed., St. Louis: USA, The CV Mosbly Company.
6. **Howard J, Barbara et all.** Clinical and Pathogenic Microbiology. Washington DC: The CV Mosby Company, **1987**.
7. **Orucu M, Geyik AF.** Yoğun Bakım Ünitesinde Sık Görülen Enfeksiyonlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, **2008**;1.
8. **Harrıhanan R, Weinstein RA.** *Enterobacteriaceae*. In: **Mayhal CG.** Hospital Epidemiology on Infection Control, Balitmore: **1996**; 345-61.
9. **Willke A, Akalın HE.** Hastane infeksiyonları etkenleri ve antibiyotik duyarlılık durumları. Hastane İnfeksiyonları. Ankara: *İnfeksiyon Hast. Derneği yayınları*, **1993**; 1: 45-53.
10. **Bahar H, Esen N, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.** *Acinetobacter* ve Non-fermantatif basiller. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 3.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2008**;1618–27.
11. **Meyer BR.** Bacterial resistance: Exploring the fact and myths, *Bull NY Acad Med*, **1987**; 63:211.
12. **Livermore DM.** Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Medicine*, **2000**; 26:14-21.
13. **Hawkey PM, Munday CJ.** Multiple resistances in gram-negative bacteria. *Reviews in Medical Microbiology*, **2004**; 15:51-61.
14. **Tetik T.** Süleyman Dermirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzole Edilen Gram Negatif Non-Fermenter Bakterilerde Metallo Beta-Laktamaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, **2008**.
15. **Usluer G.** Çoklu Dirençli Patojenler. Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, **2002**; 7: 135–41.
16. **Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Çalangu S.** Antimicrobial resistance of gram negative isolates from intensive care units in Turkey comparison to previous three years. *J Chemother*, **2000**; 12:294–98.
17. **Gür D.** *Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç*. İçinde: **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.** Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.2.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2002**; 182-93.
18. **Özsoy FM, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A.** Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora*, **2001**; 6: 3-21.
19. **Livermore DM, Williams JD.** *Beta-lactams*: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed Baltimore: **1996**; 502-578.

20. **Sanders CC, Sanders WE.** Beta-lactam resistance in Gram-negatif bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis*, **1992**; 14: 1089-1099.
21. **Sarı H.** Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA /meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta- laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul, **2005**.
22. **Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G.** Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*, **2002**;11(4):529–44.
23. **CCraig WA.** The Pharmacology of Meropenem, a New Carbapenem Antibiotic. *Clinical Infectious Diseases*, **1997**;24(2):266-275.
24. **Şenol E.** Karbapenemlerin Yeni Açılımları. *Ankem Dergisi*, **2009**; 23(Ek 2): 14-16.
25. **Gür D.** Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları, İçinde **Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D.** Önemli ve Sorunlu Gram Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları, Ankara: **2004**; 69-83
26. **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases a problem in waiting?. *Curr Opin Microbiol*,**2000**; 3:489-95.
27. **Yang Y, Bhached N, Bush K.** Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: Permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, **1995**;35:75-84.
28. **Jackson JJ, Kroop H.** Beta-lactam antibiotics induced release of free endotoxin: Invitro comparison of penicillin-binding protein (PBP)2-specific imipenem and PBP3-specific ceftazidim. *J Infect Dis*, **1992**;165:1033-41.
29. **Gudmundsson S, Erlendsdttir H, Gattfrendsson M, Gudmundsson A.** The postantibiotics effect induced by antimicrobial combinations. *Scand J Infect Dis*, **1990**; 74:80-93.
30. **Yoshimura F, Nikaido H.** Diffusion of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*, **1985**; 27:197-231.
31. **Edwards JR.** Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother*,**1995**; 36 :1-17.
32. **Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V, et study group.** 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.
33. **Saba R, Usluer G.** Ertapenem. *Flora*, **2008**; 13(ek5): 3-19.
34. **Acuna C.** Ertapenem, the first group 1 carbapenem. *Drugs of Today*, **2005**; 41(suppl A): 1-16.
35. **Hernandez JR, Velasco C, Romero L, Martinez- Martinez L, Pascual A.** Comparative in vitro activity of ertapenem against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents*, **2006**; 28: 457-9.
36. **Lee SC, Huang SS, Lee CW, Fung CP, Lee N, Shien WB, Siu LK.** Comparative antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative bacteria from community-acquired bacteremia to ertapenem in Taiwan. *BMC Infect Dis*, **2007**; 7:79.
37. **Ghuysen JM.** Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*, **1994**; 2:372-80.

38. **Chambers HF.** Penicillin-binding protein mediated resistance in Pneumococci and Staphylococci. *J Infect Dis*, **1999**; 179(Suppl 2):353-9.
39. **Gülay Z.** *Antimikrobiyal ilaçlara direnç.* **Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**: 91-108.
40. **Mederios AA.** Cooperative evolution of mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance. *Clin Microbiol Infect*, **2000**; 6(Suppl 3):3-5.
41. **Nikaido H.** Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **1989**; 33: 1831-6.
42. **Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E.** Pathogens resistant to antimicrobial agents; epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *North Am: Infect Dis Clin*, **2000**; 14:293-319.
43. **Shlaes DM, Gerding DN, John JF et al.** Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis*, **1997**; **25**: 584-99.
44. **Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA.** *Mechanisms of antibiotic resistance.* In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, **2000**; 238-53.
45. **Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R.** The astonishing complexity of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*, **2000**; 6(Suppl 3):93-4.
46. **Nikaido H.** Crossing the envelope; how cephalosporins reach their targets. *Clin Microbiol Infect*, **2000**; 6(Suppl 3):22-6.
47. **Hancock REW.** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27(Suppl 1): 93-9.
48. **Livermore DM.** Permeation of beta-lactam antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis*, **1988**; 10: 691-6.
49. **Martine Martinez L, Conejo MC, Pascual A et al.** Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**; 44: 2534-6.
50. **Domenech-Sanchez A, Hernandez Alles J, Martinez Martinez L, Benedi J, Albuti S.** Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*; its role in  $\beta$ -lactam antibiotic resistance. *J Bacteriol* **1999**; 181:2726-32.
51. **Nikaido H.** Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27(Suppl 1):32-41.
52. **Jehl F, Chomarar M, Weber M, Gerard A.** Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye, *Biomerieux Yayınları*, **2003**.
53. **Nicolas-Chanoine MH.** Inhibitor-resistant beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, **1997**; 40(1): 1-3.
54. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**; 47(8):2385-2392.

55. **Massova I, Mobashery S.** Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**;42(1):1-17.
56. **Bradford PA.** Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21 st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbial Rev*, **2001**; 14:933-51.
57. **Pool K.** Resistance to Beta-Lactam Antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, **2004**; 61:2200-23.
58. **Bambeke FV, Balzi E, Tulkens PM.** Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*, **2000**;60:45-70.
59. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**; 41: 223–32.
60. **Bush K.** New Beta-Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy, *Clinical Infectious Diseases*, 32, **2001**; 1085–9.
61. **Aydemir H.** *E. coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında GSBL araştırılması. Dışkapı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık tezi, Ankara, **2005**.
62. İnternetteErişim:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&ch20&rendertype=figure&id=ch20.fl>].
63. **Gür D.** Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora*, **1996**; 1: 80-86.
64. **Livermore D.M.** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, **1995**; 8: 557-584.
65. **Ayaz C.** *Beta Laktamaların Genel Özellikleri ve Penisilinler.* İçinde: **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.** Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemine Göre Enfeksiyonlar. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2008**; 267-268.
66. **Garau G, Garcia-Saez I, Bebrone C.** Update of the Standart Numbering Scheme for Class B  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**; 48(7):2347-2349.
67. **Garau G, Di Guilmi AM, Hall BG.** Structure-Based Phtlogeny of the Metallo- $\beta$  Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2005**; 49(7):2778-2784.
68. **Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rosolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frere JM.** The Metallo- $\beta$ -Lactamase Working Group. Standart Numbering Scheme for Class B  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2001**; 45(3):660-663.
69. **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.
70. **Gür D.**  $\beta$  - Laktamazlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2002**; 33:102-109.
71. **Gür D.** Beta-laktamazlar. İçinde **Ulusoy S.** Beta Laktamazlar ve Klinik Önemi, Ankara: Bilimsel tıp yayımevi, **2005**; 35-4.
72. **Bush K.** Classification of  $\beta$  -lactamases: Groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*, **1989**; 33: 264-70.
73. **Medeiros AA.**  $\beta$ -lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect* ,**1997**; 3(Suppl4):2-9.
74. **Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D.** Induction of beta-lactamases *Enterobacter aerogenes*. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27 (Suppl1):42-7.

75. **Gür D.** Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1997**;1:38–45.
76. **Güllü N, Gürol Y, Bülüç M, Bal Ç.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülen beta laktam direnç fenotipleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **2003**; 7: 141–147.
77. **Yuluğ N.** Beta-Laktamazlar ve Klinik Açından Önemi. *ANKEM Dergisi*, **1997**; 11:205-5.
78. **Livermore DM.** Beta-Lactamase Mediated Resistance and Opportunities for its Control, *J. Antimicrob Chemother*, **1998**; 41(suppl D):24-41.
79. **AMYES sgb.** Carbapenamase. *Ankem Dergisi*, **1997**; 11:221–24.
80. **Donald HM, Scaite W, Anyes SGB, Young HK.** Sequence analysis of ARI 1, a novel OXA blactamase responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6b92. *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**; 44:196–99.
81. **Quiroga AM, Franceshini N, Rossolini GM, Gutking G, Bonfiglio G, Franchino L, Amicosante G.** Interaction of cefotetan and the metallo beta-lactamases produced in *Aeromonas* spp and invitro activity. *Chemother*, **2000**; 46: 177–83.
82. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem Hydrolizing  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**; 41(2):223-232.
83. **Nordmann P. ve Poirel L.** Emerging Carbapenemases in Gram Negative Aerobes. *Clin. Microbiol. Infect*, **2002**; 8:321-331.
84. **Gülay Z.** Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. İçinde **Yüce A, Çakır N.** İnfeksiyon Hastalıkları. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; **2008**; 87-93.
85. **Poirel L, Nicolas D.** Characterization of VIM 2, a carbapenem hydrolyzing metalloblactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. *Antimicrob Agents and Chemother*, **2000**; 44:891-7.
86. **Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR.** Biochemical Characterization of the Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2003**; 47(2):582-587.
87. **Bush KL.**  $\beta$  -Lactamases of increasing clinical importance. *Curr Pharm Des*, **1999**; 5:839 845.
88. **Bush K.** Metallo-Beta-Lactamases: A Class Apart. *Clinical Infectious Disease*, **1998**; 1:48-53.
89. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo- $\beta$  -Lactamases: The Quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* **2005**; 18(2):306-325.
90. **Amyes SGB.** Carbapenemases *Ankem Dergisi*, **1997**; 11(2):221-5.
91. **Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frere JM and Dideberg OA.** Metallo- $\beta$ -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol*, **2005**; 345: 785–95.
92. **McManus-Munoz S, and Crowder MW.** Kinetic mechanism of metallo- $\beta$ -lactamase LI from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biochemistry*, **1999**; 38:1547-1553.
93. **Docquier J D, Lamotte-Brasseur J, Galleni M G, Amicosante J, Frere and Rossolini G M.** On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother*. **2003**; 51: 257–66.

94. **Walsh TR, MacGowe AP, Bennett PM.** Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine  $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**; 41, 1460-1464, 1997.
95. **Rasmussen BA and E Kovacs.** Identification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element Plasmid. **1991**; 25: 141-44.
96. **Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J and Chong Y.** VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.*, **2003**; 9: 868-71.
97. **Lombardi G, Luzzaro F, Docquier J D, Riccio M L, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini G M and Toniolo A.** Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**; 40: 4051-55.
98. **Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob Chemother*, **1999**; 43: 1-4.
99. **Walsh TR, M, Toleman A, Hryniewicz W, Bennett PM and Jones RN.** Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother*, **2003**; 52: 116-119.
100. **Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN and Walsh TR.** Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob Chemother*, **2003**; 52: 583-9.
101. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1991**; 35: 147-51.
102. **Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, F. Yoshimura and Kato N.** Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1994**; 38: 71-78.
103. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N and Ohta M.** A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1995**; 39: 1612-1615.
104. **Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM.** Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-Carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**; 38(3): 1290-1292.
105. **Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T and Inoue M.** Plasmid encode metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2001**; 45: 1343-48.
106. **Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, Haruta S, Sawai T, Ohara K.** Amino Acid Substitutions in a Variant of IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **2000**; 44(8): 2023-2027.
107. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the Versatile Beta-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, **2007**; 20(3):440-458.
108. **Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, and Rossolini GM.** Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet*, **1999**; 353:899-900.

109. **Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, and Rossolini GM.** IMP-12, a new plasmid encoded metallo-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**; 47:1522-1528.
110. **Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, and Livermore DM.** IMP-4, a novel metallo-β-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45:710-714.
111. **Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou FM, and Woodford N.** Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*IMP allele, *bla*IMP-7. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**; 46:255-258.
112. **Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu H-M, Wu JJ.** Outbreak of Infection with Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carrying *bla*IMP-8 in a University Medical Center in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, **2001**; 39(12):4433–4439.
113. **Hanson ND, Hossain A, Buck LL, Moland ES, and Thomson KS.** A program and abstract of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, abstr, **2004**; C1-291.
114. **Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R.** Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne Metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1998**; 43: 1584–90.
115. **Lombardi G, Luzzaro F, Docquier J D, Riccio M L, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini G M and Toniolo A.** Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM–1 metallo-β-lactamase. *J. Clin. Microbiol*, **2002**; 40: 4051–55.
116. **Scoulica E V, Neonakis I K, Gikas A I and Tselentis YJ.** Spread of *bla*VIM–1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the *bla*VIM–1 metallo-β-lactamase gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, **2004**; 48: 167–172.
117. **Poirel L, Collet L, and Nordmann P.** Carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis*, **2000**; 6:84-85.
118. **Lamotte-Brasseur J, Docquier J D, Galleni M, Amicosante G, Frere J M and G. M. Rossolini.** On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-β-lactamases. *J. Antimicrob Chemother*. **2003**; 51: 257–66.
119. **Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, and Jones RN.** First isolation of *bla*VIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**; 48:1433-1434.
120. **Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ.** Metallo-beta-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45, 2224-2228.
121. **Giske CG, Rylander M, and Kronvall G.** VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**; 48:3034-3035.
122. **Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R G, Rossolini M and Cornaglia G.** Detection of VIM–5 metallo-β-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J. Antimicrob. Chemother*, **2004**; 54: 282–283.

123. **Koh TH, Wang GCY, and Sng LH.** IMP-1 and a novel metallo- $\beta$ -lactamase, VIM- 6, in fluorescent *Pseudomonas* isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**; 48:2334-2336.
124. **Toleman MA, Rolston K, Jones RN, walsh TR.** Bla VIM-7 evolutionary distinct metallo-beta-lactamase gene in *P. aeruginosa* isolate from United States. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**; 78:329-322.
125. **Gales AC, Menezes LC, Silbert S, and Sader HS.** Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, **2003**; 52:699-702.
126. **Castanheira M, Toleman M A, Jones R N, Schmidt F J and Walsh T R.** Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**; 48: 4654-61.
127. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K et al.** Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, **2009**; 53:5046-54.
128. **Centers for disease Control and Prevention (CDC).** Detection of *Enterobacteriaceae* isolates Carrying Metallo-beta-lactamase in United State. *MMWr Morb Mortal Wkly rep*, **2010**; 59: 750.
129. **Tijet N, Alexander DC, Richardson D, Lastovetska O, Low DE, Patel SN, et al.** New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*, **2011**; 17: 306-307.
130. **Chihara S, Okuzumi K, Yamamoto Y, Oikawa S, Hishinuma A.** First case of New delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Escherichia coli* infection in Japan. *Clin Infect Dis*, **2011**; 52: 153-154.
131. **Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P.** Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother*, **2011**; PMID: 21628303.
132. **Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V et al. (First 6 authors then et al.).** Emergence of NdM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*, **2011**; PMID: 21646490.
133. **Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR.** Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*, **2011**; 66(4): 689-92.
134. **Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P.** Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo-beta-Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*, **2010**; 54:2420-4.
135. **Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T et al.** KHM-1, a novel plasmid mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, **2008**; 52:4194-7.
136. **Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD et al.** FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**; 57:410-6.
137. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11:381-93.

138. **Payne DJ, Hueso- Rodriguez JA, Boyd H, Concha NO, Janson CA, Gilpin M, Bateson JH, Cheever C, Niconovich NL, Pearson S, Rittenhouse S, Tew D, Diez E, Perez P, De La Fuente J, Rees M and Rivera-Sagredo A.** Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2002**; 46: 1880–86.
139. **Yan JJ, Wub JJ, Tsai TS, Chuang L C.** Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2004**; 49: 5-11.
140. **Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M.** Convenient Test for Screening Metallo-  $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**; 40-43.
141. **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.
142. **Franklin C, Liolios L. ve Peleg Y.** Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible Metallo-Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**; 3139-3144.
143. **Yong D, Lee K, Yum JM, Shin HB, Rossoloni GM, Chong Y.** Imipenem –EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-Beta- Lactamase Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:3798-3801.
144. **Yedekçi S.** Genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinde “Phe-Arg-B-Naphthylamide”nin Kinolon Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2010**.
145. **Saraç G.** Hastane Enfeksiyonu Etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Karbapenem Direnci ve Direncin Moleküler Olarak Saptanması. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin, **2011**.
146. **Akalın H.** Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. Doğanay M, Ünal S. Hastane İnfeksiyonları. Ankara, Bilim TıpYayınevi, **2003**; 269–89.
147. **Fritshe TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN.** Emerging metallo-betalactamase-mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*, **2005**; 41:276-8.
148. **Champs C, Henguell C, Guelon D, et al.** Clinical and Bacteriological Study of Nosocomial Infections Due to *Enterobacter aerogenes* Resistant to Imipenem. *J Clin Microbiol*, **1993**; 31(1):123-7.
149. **Turner PJ.** MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2009**; 63:217-22.
150. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, **2011**. (EARSNet).
151. **Kaur A, Gupta CV, Chhina D.** Prevalence of metallo-beta-lactamase-producing(MBL) *Acinetobacter species* in a tertiary care hospital. *Iranian Journal of Microbiology*, **2014**; 6:22-25.

152. **Uma Karthika R, Srinivasa Rao R, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K.** Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. *Journal of Medical Microbiology*, **2009**;58: 430-435.
153. **Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mik Cem Derg*, **2002**; 33:203-206.
154. **Akan OA.** Antibiotic resistance of *A. baumannii* isolates: Data from İbni Sina Hospital for the year 2002. *Mikrobiyol Bul*, **2003**; 37:241-6.
155. **Tatman-Otkun M, Gürcan S, Özer B, Shokrylanbaran N.** Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. *New Microbiol*, **2004**; 27:1-8.
156. **Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç AE, Önde U, Acar N.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. XXX. *Türk Mik Cem kongre Kitapçığı*, **2002**; 280.
157. **Toraman Aşçı Z, Çelik A.** Investigation of antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*. Which isolated from clinical specimens. *Fırat Med Jour*, **2003**;8.
158. **Dinç FT.** Non-Fermentatif Gram Negatif Bakterilerde Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bursa, **2013**.
159. **Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik Direnci ve metallo-Beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Dergisi*, **2011**; 25:42-47.
160. **Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD.** Prevalance and Characterization of Metallo-Beta-Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diag Microbiol Infect Dis*, **2004**; 48(2):131-5.
161. **Mansur A.** Turgut Özel Tıp Merkezinde 2009 yılında Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında Antibiyoti Direnç, İndüklenebilir Beta-Laktamaz ve Metallo Beta-Laktamaz Oranlarının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Malatya, **2010**.
162. **Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y.** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*, **2003**; 41(10):4623-4629.
163. **Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO et al.** Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas spp.* in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J*, **2009**; 50(3):335-339.
164. **Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V.** Comparison of Two Methods to Detect Carbapenemase and Metallo Beta Lactamase Production in Clinical Isolates. *Indian J. Med. Res*, **2005**; 121: 780-783.
165. **Oh EJ, Lee S, Park YJ et al.** Prevalence of metallo-β-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. *J Microbiol Methods*, **2003**; 54:411-8.
166. **Borsa BA.** Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Fenotipik Yöntemlerle Gösterilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul, **2009**.

167. **Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S.** bla(IMP) and bla(VIM) mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *J Infect Dev Ctries*, **2012**;6:757-62.
168. **Shivaprasad A, Antony B, Shenoy P.** Comparative Evaluation of four phenotypic test for detection of metallo-beta-lactamase and carbapenemase production in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Diagn Res*, **2014**; 8(5): DC05-DC08.
169. **Bulut Y, Çağlar H.** Gram negatif-non fermentatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz enzimlerinin farklı yöntemlerle gösterilmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **2013**; 27(3):135-140.
170. **Bora A, Sanjana R, Kumar Jha B, Narayan Mahaseth S and Pokharel K.** Insidance of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC Research Notes*, **2014**; 7;557.
171. **Alışkan HE, Çolakoğlu Ş, Bostanoğlu E, Turunç T, Göçmen JS.** İki Yıllık Süreçte Yapılan Modifiye Hodge Testi Sonuçlarının İrdelenmesi. *Ankem Derg*, **2011**; 25:169-172.
172. **Dede BY.** Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları. Tıpta Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2006**.
173. **Fidan I, Çetin Gürel F, Yüksel S, Sultan N.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarındaki antibiyotik direnci ve metallo-beta laktamaz sıklığı. *Ankem Dergisi*, **2005**; 19(2):68-70.
174. **Aksoy MD.** Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Metallo-Beta-Laktamaz Enzimlerinin Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık tezi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne, **2013**.
175. **Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ, Karahan ZC, Baran I, Kurşun Ş.** İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Üretimini Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Der*, **2011**; 41:29-36.
176. **Sesli Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu Arıdoğan B.** *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2009**; 23(2):51-5.
177. **Çıkman A.** Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, **2011**; 18 (3):132-135.
178. **Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* **2009**; 23 (2): 57-62.
179. **Güçlü AÜ, Kılıç A, Bedir B, Yılmaz S, Güney M.** Yoğun Bakım ünitelerinden izole edilen karbapenemaz aktivitesi gösteren çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *Gülhane Tıp Derg*, **2013**; 55: 176-180.
180. **Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A.** Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother*, **2008**; 61(4):827-830.
181. **Irfan S, Zafar A, Guhar D, Ahsan T, Hasan R.** Metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit patients of a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiol*, **2008**; 26(3):243-5.

182. **Khakhkhar VM, Hangiam BC, Bhuvu PJ, Ballal M.** Detection on Metallo-Beta-Lactamase Enzymes Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Various Clinical Samples. *Hjirm*, **2012**;3:4-9.
183. **Gupta V.** Metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs*, **2008**; 17: 131-43.
184. **Canberk MF.** Non-fermentatif Gram Negatif Çomaklarda Metallo-Beta-Laktamazların araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, **2009**.
185. **Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S.** Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz oranlarının belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg.* **2008**; 22:49-52.
186. **Limoncu MH, Ermertcan Ş, Çavuşoğlu C, Eraç B.** The investigation of metallo-beta-lactamase enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species isolated from nosocomial infections. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2006**; 36:79-82.
187. **Altöparlak U, Aktaş F, Çelebi D, Özkurt Z, Akçay MN.** Prevalence of Metallo-Beta-Lactamase Among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Burn Wounds and in Vitro Activities of Antibiotic Combinations Against These İzolates. *Elsevier, Burns*, **2005**; 31;707-710.
188. **Eser Ö, Ergin A, Haşçelik G.** *Acinetobacter* türlerinde Antimikrobiyal direnç ve Metallo Beta Laktamaz Yapımı. 32. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı, Antalya, 12-16 Eylül, **2006**:150.
189. **Çakar A.** Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri' nde Ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Enziminin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Ayrıştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2005**.
190. **Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Gülay Z, Arslan U, Nevgun SÖ, Bayramoğlu G, Berktaş M, Yalçın AN, Gencer S, Hoşoğlu S, DEmiröz AP.** Türkiye'de Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz enzimlerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Türkiye klinikleri, J Med Sci*, **2012**; 32(3):687-93.
191. **Aşık L.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* Klinik İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2006**.
192. **Topçu Albayrak G.** Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Çift Disk Sinerji Testi ve kombine Çift Disk Sinerji ile Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, **2008**.
193. **Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M.** Yoğun Bakımda İzole Edilen *Pseudomonas spp.* Suşlarında Metallobetalaktamaz Sıklığının Araştırılması. *Ankem Derg*, **2011**; 25; (3) 150-6.
194. **Migliavacca R, Docquer J-D, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L.** Simple Microdilution Test for Detection of Metallo-Beta-Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2002**; 40: 4388-4390.
195. **Özçınar H.** Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Direnç, İndüklenebilir Beta-Laktamaz ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, **2013**.

196. **Arabacı F, Oldacay M.** Yoğun Bakım Servisinde Yatan Hastalardan izole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg*, **2010**; 40; (1) 37-40.
197. **Şimşek M, Sultan N.** *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerine ait klinik izzolatlara metal-beta-laktaaz yapımının farklı fenotip yöntemlerle incelenmesi. *Türk Klinik laboratuar Dergisi*, **2010**; 1:11-16.
198. **Türk Dağı H, Kuş H, Keyik S, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D.** Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Ankem Dergisi*, **2012**; 36(4):187-192.
199. **Iraz M, Duzdun AO, Çiçek AC, Bonnin RA, Ceylan A, Saral A, Nordmann P, Sandalli C.** Characerization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2014**; 78:292-294.

## ÖZGEÇMİŞ

Kırşehir’de 1982 yılında doğdu. İlköğrenimini Van Atatürk ve Şanlıurfa Profilo İlkokulunda, ortaöğrenimini Şanlıurfa Merkez Ortaokulunda ve liseyi 1995-2000 yılları arasında Davut Zeki Akpınar Süper Lisesinde tamamladı. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladı ve 2005 yılında Fakülte üçüncüsü olarak mezun oldu. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2005-2006 eğitim ve öğretim yılında Çukurova Üniversitesi Yabancı Diller Merkezinde İngilizce hazırlık okudu. 2006 Haziran-Ağustos tarihleri arasında EF Dil Okulları aracılığı ile İngiltere Brighton’da dil eğitimi aldı. 2009 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalın’da doktora eğitimine başladı. 2013 Ocak-Temmuz tarihleri arasında Erasmus staj hareketliliği programı ile İtalya Roma’da bulunan “Istituto Superiore di Sanità” enstitüsünde staj yaptı.