

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ OLAN *ACINETOBACTER
BAUMANNII* SUŞLARI İLE GRAM NEGATİF ENTERİK
BAKTERİLERDE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN SİNERJİSTİK
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Güle AYDIN

**KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail BALIK**

ANKARA – 2012

ÖNSÖZ

Öncelikle Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları eğitim ve öğretim hayatım boyunca büyük emekleri geçen, hem hekimlik mesleğine hem de hayata yaklaşımlarıyla bana örnek olan, her zaman hoşgörü ve sabırla yaklaşan, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım; sayın bölüm başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. İsmail Balık, sayın Prof. Dr. Dr. Halil Kurt, sayın Prof. Dr. Fügen Yörük, sayın Prof. Dr. Alpay Azap, sayın Doç. Dr. Serhat Birengel ve sayın Doç Dr. K. Osman Memikoğlu'na sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Güler yüzlerini bizden esirgemeyen ve bizim için hep daha iyi olanı yapmaya çalışan uzmanlarımız Dr. Aysun Yalçı ve Dr. Gülden Yılmaz'a, başta güzel yüreği ve güçlü kişiliğiyle Dr. Zeynep Köken Bayındır olmak üzere birlikte geçirdiğimiz neşeli anlar için tüm asistan arkadaşlarıma, emekleriyle ve içtenlikleriyle her zaman işleri daha da kolaylaştıran kliniğimizin çok kıymetli hemşire hanımlarına, sağlık memurlarına, laboratuvar görevlilerine ve bütün personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta; kendisini tanımaktan onur duyduğum ve yeri geldiğinde insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim Dr. Haluk Güriz olmak üzere tüm Cebeci Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı personeline içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin veri toplanması aşamasında her türlü yardımı yapan Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Devran Gerçeker, Doç.Dr. Ebru Us, Dr. Hüseyin Haydar Kutlu ile tüm laboratuvar çalışanlarına, veri toplanması aşamasında kaynaklarını paylaşan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Alper Tekeli ve Dr Hakan Keskin'e ve kliniğimiz mikrobiyoloji laboratuvarı sorumlusu Meşure Coşkun'a tek tek saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca sadece asistanlığımın beş yılı boyunca değil, ömrümün her anında sevgilerini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim anneme, babama, kardeşime ve eşime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakteriler.....	3
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi ve <i>Klebsiella</i> Cinsi	6
2.3. Bakterilerde Antibiyotik Direnci.....	13
2.3.1. Doğal Direnç.....	13
2.3.2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç	14
2.3.3. Kazanılmış Direnç	14
2.3.3.1. Biyokimyasal mekanizmalar	15
2.3.3.2. Genetik mekanizmalar.....	15
2.4. <i>Acinetobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler ve Bu Antibiyotiklere Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar	17
2.4.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları.....	17
2.4.1.1. Penisilinler	18
2.4.1.2. Sefalosporinler	20
2.4.1.3. Beta-laktamaz inhibitörleri.....	22
2.4.1.4. Monobaktamlar.....	24
2.4.1.5. Karbapenemler	38
2.4.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları.....	47
2.4.3. Tetrasiklin Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları.....	49
2.4.4. Kloromfenikol ve Direnç Mekanizmaları	51
2.4.5. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç	52
2.4.6. Sülfonamidler, Trimetoprim ve Direnç Mekanizmaları	53

2.4.7. Polimiksin Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları.....	54
2.5. <i>Acinetobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerde Tedavi	55
2.6. <i>Acinetobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerde Tedavide Kombine Antibiyotik Kullanımı	56
3. GEREÇ ve YÖNTEM	59
3.1. Örneklerin Toplanması	59
3.2. İdentifikasyon ve Duyarlılık Testleri	60
4. BULGULAR.....	63
4.1. Klinik İzolatların Özellikleri	63
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
ÖZET	79
SUMMARY.....	81
7. KAYNAKLAR	83

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
DNaz	: Deoksiribonükleaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
PBP	: Penisilin bağlayan protein
ADC	: <i>Acinetobacter</i> derived cephalosporinase (<i>Acinetobacter</i> kaynaklı sefalosporinaz)
GyrA	: DNA giraz enziminin alt birimi
GyrB	: DNA giraz enziminin alt birimi
ParC	: Topoizomeraz IV enziminin alt birimi
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
IMP	: İmipenemaz
VIM	: Veronese imipenemaz
IRT	: İnhibitör rezistan TEM
NCCLS	: The National Committee for Clinical Laboratory Standards (Amerikan Ulusal Klinik Laboratuar Standartlarını Belirleme Komitesi)
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve laboratuar standartları enstitüsü)
DHP	: Dihidropeptidaz

MRSA	: Metisilin rezistan <i>S.aureus</i>
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaz)
NDM	: New Delphi Metallobeta-lactamase
ARI	: <i>Acinetobacter</i> rezistan imipenem
NaCl	: Sodyum klorür
ATCC	: American Type Culture Collection
EMB	: Eosin metilen blue agar
MHT	: Müller Hinton Agar
MBL	: Metallo Beta-Laktamaz
MHA	: Müller Hinton agar
TSI	: Triple Sugar Iron Agar (üç şekerli besiyeri)
PCR	: Polimerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
EDP	: Energy Dependent Phase
RNA	: Ribonükleik asit
tRNA	: Transfer ribonükleik asit
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
Tet	: Tetrasiklin
PABA	: Para aminobenzoik asit
dhps	: dihidropteroik asit sentetaz
dhfr	: dihidrofolat redüktaz

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde tıbbi önemi daha fazla olan cins ve türler.....	7
Tablo 2. Beta-laktamaz enzimlerin sınıflandırılması.....	29
Tablo 3. 2010 yılı CLSI GSBL sınır değerleri -M 100- S20-U (Haziran 2010)	37
Tablo 4. Substrat ve inhibisyon profiline göre karbapenemazlar.....	41
Tablo 5. 2010 Yılı CLSI karbapenem sınır değerleri -M 100- S20-U (Haziran 2010)	44
Tablo 6. <i>A.baumannii</i> suşlarının kliniklere göre dağılımı	63
Tablo 7. <i>A.baumannii</i> suşlarının örneklere göre dağılımı (n=40)	64
Tablo 8. <i>K.pneumoniae</i> suşlarının kliniklere göre dağılımı (n=20)	64
Tablo 9. <i>K.pneumoniae</i> suşlarının örneklere göre dağılımı (n=20)	64
Tablo 10. Kolistine duyarlı olan <i>A.baumannii</i> izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20).....	65
Tablo 11. Kolistine dirençli olan <i>A.baumannii</i> izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20).....	65
Tablo 12. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20)	66
Tablo 13. Kolistin duyarlı olan çoklu ilaca dirençli <i>A.baumannii</i> izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20).....	67
Tablo 14. Kolistin dirençli olan çoklu ilaca dirençli <i>A.baumannii</i> izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20).....	68
Tablo 15. Çoklu ilaca dirençli <i>K.pneumoniae</i> izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20)	68
Tablo 16. Çoklu ilaca dirençli olan <i>A.baumannii</i> izolatlarında kolistine duyarlı ya da dirençli olma ile antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin karşılaştırılması	69
Tablo 17. Çoklu ilaca dirençli olan <i>K.pneumoniae</i> izolatlarında antibiyotik duyarlılıkları ile antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin karşılaştırılması (n=20)	70

1. GİRİŞ

Toplumdan ve özellikle hastaneden izole edilen gram negatif bakterilerde antibakteriyel ilaçlara karşı artan direnç hem dünyada hem de ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından bir tanesi haline gelmiştir (1,2). Bu bakterilerin neden olduğu hastane infeksiyonlarındaki artış hasta morbidite ve mortalitesini arttırmakla birlikte hastanede yatış süresini de uzatarak maliyet artışıyla birlikte ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3,4). Gram negatif bakterilerdeki çoklu ilaç direncindeki artışla yeni antibakteriyel gelişimindeki artış paralel seyretmemektedir. Bunun sonucunda da bu bakterilerle oluşan infeksiyonlara uygun tedavi seçenekleri bulmak giderek zorlaşmaktadır (1). Yine bu bakterilerin gerek nozokomiyal salgınlar oluşturarak gerekse tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirerek klinisyenlere yaşattıkları sıkıntılar ise hem kolistin gibi eski antibiyotiklerin kullanımını hem de antibiyotiklerin kombine kullanımını gündeme getirmiştir (5,6,7). Antibiyotiklerin kombine kullanılması özellikle polimikrobiyal infeksiyonların tedavisinde, tek antibiyotikle tedavi edilemeyen iki ayrı infeksiyon varlığında, etkeni bilinmeyen infeksiyonların tedavisinde, antibiyotiklere dirençli izolatlarla karşı sinerjistik etki sağlanmasında, yüksek mortaliteyle seyredebilecek ciddi infeksiyonların tedavisinde, ilaçların doza bağlı yan etkilerinin azaltılmasında olumlu sonuçlar doğurabilmektedir (8).

Antibakteriyel ilaç direncinde artış görülen gram negatif bakteriler içinde *Acinetobacter* cinsi bakterilerle, *Enterobacteriaceae* ailesi önemli bir yer tutmaktadır (9,10). Her iki bakteri grubu da sıklıkla hastane infeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (9,11). Bu etkenlerin hastane infeksiyonlarında sık olarak saptanmalarının nedenleri, antibakteriyellere karşı artan oranlarda direnç kazanmaları ve dış ortam koşullarına dayanıklı olmalarıdır (12,13,14).

Acinetobacter cinsi içinde *Acinetobacter baumannii* antibiyotiklere en çok dirençli olan ve hastane infeksiyonlarından en sık izole edilen tür olarak

karşıımıza çıkmaktadır (15). *Enterobacteriaceae* ailesi içinde ise özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan ve/veya karbapeneme dirençli olan *Klebsiella pneumoniae* suşları hastane infeksiyonlarında ve antibakteriyel direnç gelişiminde öne çıkan tür olmaktadır (16). Her iki türün aynı zamanda hastane epidemilerine de neden oldukları, hastanede yatış süresini uzattıkları ve morbidite ve mortalitede ciddi artışlara yol açtıkları da bilinmektedir (9,16).Yine bu bakterilerde direnç mekanizmalarının farklı türler arasında aktarılabilir olması ve çabuk yayılması, ayrıca değişikliklere uğrayarak çeşitlilik kazanması tedavide sıkıntılara neden olmakta ve yeni tedavi seçeneklerinin değerlendirilerek klinik uygulamalara kolaylık sağlanması gerekmektedir.

Bütün bu nedenlere dayanarak bu çalışmada; hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarlarımıza gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 20 tane kolistine duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli, 20 tane kolistine ve çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* suşu ile 20 tane hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz hem de karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşunda çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro etkilerinin E-test yöntemi ile değerlendirilmesi ve çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* infeksiyonları ile GSBL ve karbapenemaz salgılayan gram negatif enterik bakteri infeksiyonlarında kullanılabilecek sinerjistik etkili kombinasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter* Cinsi Bakteriler

Acinetobacter ilk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş, DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle de 1939 yılında tanımlanmıştır (17,18).

Acinetobacter cinsindeki bakteriler üremenin logaritmik fazında kısa, iri, 1,0–1,5 µm uzunluğunda basil, üreme dışında ise kok veya daha çok kokobasil şeklinde, ikişerli, kümeler halinde veya kısa zincirler yapmış gram negatif bakteriler olarak görülür (19,20). Genellikle düzgün, bazen mukoid, renksiz koloniler oluşturur. 35-37°C'de üremeyi seven, oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, nitratları redükte etmeyen, zorunlu aerob üreyen, deoksiribonükleaz (DNaz) negatif, nonfermantatif bakterilerdir (19). Diğer nonfermantatif bakterilerden ayırmada kullanılacak ilk test oksidaz testidir (21). Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır ve hareketsizdirler. Üç şekerli demirli besiyeri ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (20,22). *Acinetobacter* cinsi bakteriler laboratuarlarda sıklıkla kullanılan eozin metilen blue (EMB) agar ve kanlı agar gibi pek çok besiyerlerinde kolayca ürerler. Bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir (21,23). Diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden bromkrezol moru, safra tuzları, laktoz ve maltoz içeren Herellea agar ile klinik örneklerden, vankomisin, sefsulodin ve sefradin içeren Leeds *Acinetobacter* Medium ve Holton's agar ile de hem klinik örnekler hem de çevreden izole edilebilmektedirler (19,23).

DNA benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda *Acinetobacter calcoaceticus*, *A.baumannii*, *A.haemolyticus*, *A.junii*, *A.johnsonii*, *A.lwoffii*, *A.radiorezistens*, *A.schindleri*, *A.ursingii* ile birlikte 19'dan fazla tür belirlenmiştir (19,24). Biyokimyasal reaksiyonlara ve üremeözelliklerine göre de *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır. Fenotipik özellikler temelinde

Acinetobacter türlerini ayırt etmek zor olduğundan, bazen *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* complex terimi kullanılmaktadır (24).

Acinetobacter türleri arasında en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan etken *A.baumannii*'dir (21,25). *A.baumannii* hemoliz yapmaz, glukozu oksitler, 44 °C'de üreyebilir ve tüm bu özellikleri ile de diğerlerinden ayırt edilebilir (26). Glukozu oksitlemeyen türlerden hemoliz yapan tür *A.haemolyticus*, hemoliz yapmayan türise *A.lwoffii* olarak adlandırılır. *A.johnsonii* diğer türlerden 37 °C' de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilir (19,25,27).

Acinetobacter cinsi bakteriler, kuruluğa, farklı ısı ve pH değerlerine dayanıklı oldukları, yaşamlarını sürdürebilmek için çok az şeye gereksinim duydukları ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabildikleri için doğada toprak ve sularda, ayrıca yiyeceklerde ve cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler (27).

Acinetobacter kökenlerinin sağlıklı insanların ağız, üst solunum yolları, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinin florasında bulundukları belirlenmiştir (21,28). *Acinetobacter* cinsi bakteriler genel olarak virölansı düşük patojenlerdir. Konak savunma mekanizmaları normal olan bireylerde infeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı infeksiyonlara neden olmaktadır (28). İmmün sistemi baskılanmış kimselerde ve hastanede yatan hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedirler. Özellikle çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* suşları başta olmak üzere *Acinetobacter* türlerinin nozokomiyal bakteriyemi, genitoüriner sistem infeksiyonları (daha çok kateter uygulamasına bağlı), intrakraniyel infeksiyonlar (esas olarak cerrahi girişimlerden sonra), solunum sistemi infeksiyonları (entübasyon ve trakeostomi sonrası), yumuşak doku infeksiyonları oluşturduğu fırsatçı infeksiyonlardandır (29). Sıklıkla hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilmelerine rağmen toplum kökenli infeksiyonlardan izole edilen suşlar da bulunmaktadır (28).

Acinetobacter cinsi bakterilerle kolonizasyon ve infeksiyonu kolaylaştıran risk faktörleri arasında malignite, yanık, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, geçirilmiş cerrahi operasyon, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, trakeostomi varlığı, travmatik yaralar, bağışıklık sisteminin baskılanması ve konağın yaşı bulunmaktadır (30,31,32).

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak düşük virülanslı olarak kabul edilmelerine rağmen virülanstan sorumlu faktörler de vardır;

1- Polisakkarit kapsül: Kapsül fagositozu önler ve selektif kompleman eksikliği olan bireylerde infeksiyona yatkınlık yaratabilir (19,28). L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşup, bakteri yüzeyinin hidrofilik olmasını sağlar ve fagositozdan korur. İntravenöz kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır

2- Fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

3- Lipid A: Hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.

4- Lipid yıkan enzimler üreterek dokularda hasara neden olurlar.

5- Aerobaktin ve siderofor gibi demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretilmesi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir.

A.baumannii ampicilin, amoksisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere doğal direnç özelliği gösterir (33). *A.baumannii* diğer türlere göre daha dirençlidir (9).

Son yıllarda özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artması ile *Acinetobacter* türlerinde görülen direnç oranının arttığı

gözlenmektedir. Bu nedenle farklı tedavi protokolleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (31,34).

Acinetobacter'in nozokomiyal suşlarında sıkça görülen direnç mekanizmaları beta-laktamazları, hücre duvarı kanallarında değişiklikleri ve efluks pompalarını kapsar. *A.baumannii*, *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlarla kinolonlara ve aminoglikozid modifiye edici enzimleri salgılayarak, aminoglikozidlere dirençli hale gelebilir (26). Özellikle üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın kullanımının, karbapenemlere dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (35).

2.2. Enterobacteriaceae Ailesi ve Klebsiella Cinsi

Enterobacteriaceae ailesi, tıbbi önemi olan gram negatif basiller içinde en büyük ve heterojen ailedir. Aile içinde 40'dan fazla cins ve 150'den fazla tür bulunmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan türler biyokimyasal özellikleri, antijenik yapıları ve nükleik asit hibridizasyon ve DNA dizi analizlerine göre sınıflandırılmaktadır. Her geçen gün bu büyük aileye yeni üyeler eklenebilmekte ya da genetik analizler sonucu mevcut türlerin isimleri değişebilmektedir (36).

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin birçoğu, toprakta, suda, bitkilerde ve bir kısmı da insan ve hayvanların barsak floralarında bulunurlar. Bazı koşullarda *Enterobacteriaceae* üyeleri insanlarda barsak dışında da kolonize olabilirler. Alkoliklerde, diyabet hastalarında, antibakteriyel tedavi alanlarda ve hastanede yatan hastaların üst solunum yollarında kolonizasyon görülebilir. Ayrıca rahim içi araç kullanan kadınlarda ve post-menapozal dönemde vajinal kolonizasyonda artış görülür. *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan türlerin birçoğu doğada saprofit olarak veya bitki patojeni olarak bulunmaktadır. Ayrıca birçok cins ve tür de insana ait klinik örneklerden çok nadiren izole edilmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin neden olduğu infeksiyonların %95'i yaklaşık olarak 20 tür ile oluşmaktadır (37,38).

Enterobacteriaceae ailesinde yer alan bakteriler genellikle homojen boyanan, 2-3 µm boyunda, 0,5-0,6 µm eninde spor oluşturmeyan bakterilerdir. Bu bakterilerin tanımlanmasında yaklaşık 46 farklı biyokimyasal testten faydalanılır. Oksidaz negatif olmaları, glukozu fermente etmeleri ve nitratı nitrite indirgemeleri tanımlanmalarına yardımcı olan en önemli biyokimyasal özelliklerindendir (36,37,38).

Bakteriyolojinin birçok alanında olduğu gibi *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de cins, tür, alt-tür, biyogrup ve serotip düzeyinde sınıflandırma yapılmaktadır (36). Bu sınıflamada yer alan cins ve türler Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* ailesinde tıbbi önemi daha fazla olan cins ve türler

Cins	Tür
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> <i>koseri</i> <i>amalonaticus</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> <i>aerogenes</i> <i>sakasakii</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> <i>albertii</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> <i>oxytoca</i> <i>granulomatis</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Pantoea</i> (önceden <i>Enterobacter</i>)	<i>agglomerans</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i> <i>rettgeri</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
<i>Shigella</i>	<i>dysenterii</i> <i>flexneri</i> <i>sonnei</i> <i>boydii</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i> <i>enterocolitica</i> <i>pseudotuberculosis</i>

*Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Seventh Edition

Tez çalışmasında değerlendirilen bakterilerin tümü *Klebsiella* cinsinin *Klebsiella pneumoniae* türüne ait oldukları için burada sadece bu cins vetürün özelliklerinden bahsedilecektir.

Klebsiella cinsi adını 19. yüzyıl sonlarında yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. Daha sonra *Klebsiella pneumoniae*'nin yaptığı ağır ve ölümcül pnömoni tablosu Carl Friedlander isimli araştırmacı tarafından tanımlanmış ve uzun yıllar *Klebsiella* "Friedlander basili" olarak isimlendirilmiştir (37,39).

Klebsiella türleri doğada yaygın olarak toprak ve sularda bulunurlar. İnsan ve hayvan gastrointestinal sistemi, üst solunum yolları florasında da yer alırlar. İlk izole edildiklerinde besiyerinde büyük mukoid koloniler oluştururlar (36). Mac-Conkey agarda oluşturdukları koloniler tipik olarak geniş, mukoid ve kırmızıdır. Etrafındaki agara doğru yayılan kırmızı renk laktoz fermentasyonu ve asit üretiminin göstergesidir (39). Bazı mukoid *Enterobacter* türleri inceleme sırasında *Klebsiella* ile karışabilir. Tüm *Klebsiella* türleri ornitini dekarboksile etmezken, karakteristik olarak *Enterobacter* türlerinin büyük çoğunluğu ornitin dekarboksilaz pozitifdir (39).

Klebsiella cinsi bakteriler gram negatif hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü basillerdir (36).

Klebsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica* *Klebsiella* cinsinde yer alan bakteri türleridir (36).

Klebsiella cinsi içindeki türlerden üç tanesi insanlardaki infeksiyonlardan sorumludur; bu türler *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *K.granulomatis*'tir. *K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis*, *K.pneumoniae*'nin karakteristik klinik belirtileri olan ve fermentasyon yapmayan alt türleri olarak düşünülmektedirler. Ancak spesifik infeksiyonlardan izole edilmeleri nedeniyle kendi isimleriyle rapor edilmektedirler (36,37).

Klebsiella cinsi bakteriler, ısıya dayanaksız olup nemli ortamda 55°C'de 30 dakikada ölürlür. Oda sıcaklığında tutulan kültürlerde haftalarca, +4°C soğukta aylarca canlı kalırlar (37,39). *Klebsiella spp.* kapsülleri olması nedeniyle kuruluğa oldukça dirençlidir, cilt ve eşyalar üzerinde uzun süre kalarak çapraz infeksiyonlara neden olabilirler. Özellikle organik maddelerde kurutulurlarsa aylarca canlı kalabilmektedirler. Üremeleri için kan, serum, asit sıvısı, glukoz gibi özel besin maddelerine gereksinim duymazlar (40).

Klebsiella türleri aerob veya fakültatif anaerob bakterilerdir. Optimal 37°C'de ve pH 7'de ürerler. Ancak *K.pneumoniae* dışındaki türler 4-44°C arasında da üreyebilmektedirler. Genel kullanım besiyerlerinde rahatlıkla ürerler. Sıvı besiyerlerinde homojen, bulanık ve dipte mukoz bir çökelti oluştururlar. Katı besiyerindeki kolonileri polisakkarit kapsülleri nedeniyle mukoid nitelikte, büyük ve akıcı kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda S ve R kolonilerine dönüşebilirler (37,40).

Metabolik olarak aktif bir bakteri olan *Klebsiella* birçok karbonhidratı asit ve gaz oluşturarak fermente eder. D-glukoz, laktoz, sukroz, mannitol, adonitol, trehaloz ve mukat fermente ettikleri maddelerdir. Ancak türler arasında fermente ettikleri maddeler açısından birliktelik yoktur. *K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis* dışında tüm türler laktozu fermente eder. *K.rhinoscleromatis* laktoz gibimukadı da fermente edemez (41,42).

Klebsiella'lar karbon kaynağı olarak malonat ve sitratı kullanırlar. *K.rhinoscleromatis* ise sitratı kullanamaz (42).

Klebsiella cinsi bakterilerin oksidaz aktiviteleri yoktur. Deoksiribonükleaz enzim aktivitesine sahip değildir. *K.oxytoca*, *K.ornithinolytica* ve *K.planticola* bir aminoasit olan triptofanı indol, pirüvik asit ve amonyak oluşturarak metabolize ederler. Karbonhidrat metabolizmalarının ara ürünü olarak asetil-metilkarbinol (asetoin) oluştururlar (*K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis* hariç) (40,42).

Klebsiella türlerinin çoğu üreyi yavaş hidrolize eder ve Christensen'in üre agarında parlak pembe renk değişimine neden olurlar (*K.rhinoscleromatis* ve *K.terrigena* hariç) (39).

Klebsiella pneumoniae laktozu ve eskülini fermente eder. Metil kırmızısı reaksiyonu negatif, Voges-prauskauer reaksiyonu pozitifdir. Sitrata tek karbon kaynağı olarak kullanabilir. *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca*'yı ayırmada triptofandan indol üretimi kullanılabilir. *K.pneumoniae* indol negatif ve *K.oxytoca* indol pozitifdir (39,43).

Klebsiella cinsi bakterilerden yalnızca *K.rhinoscleromatis*'de lizin dekarboksilaz enzimi yoktur ve bu nedenle lizini kadaverine dönüştüremez. Sadece *K.ozaenae* arjinin dihidrolaz enzimi ile arjinini sitriline dönüştürebilir. Ornitin dekarboksilaz enzimi ile ornitini putresine dönüştürebilme yeteneği *K.ornithinolytica*, *K.ozaenae* ve *K.terrigena*'da gözlemlenir. *Klebsiella* cinsi bakteriler, H₂S üretmezler, fenilalanini deamine etmezler. *K.pneumoniae*, *K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis* laktozdan gaz oluştururlar (39,41,42,43).

Klebsiella cinsi bakterilerin geniş polisakkarit kapsülü, bakteri hücresinifagositozdan koruyan ve lökosit göçünü geciktiren önemli virülans faktörüdür. Kapsülde polisakkarit yapısında olan O ve K antijenleri bulunmaktadır (39). Bu antijenlere karşı elde edilmiş antiserumlarla lam ve tüp aglütinasyonları, kültür süzöntüsü ile presipitasyon ve Neufeld'in kapsül şişme reaksiyonu ile *Klebsiella*'lar tiplendirilebilir (39). Kapsül şişme reaksiyonunda aslında özgül serumlarla karşılaştırılan bakterilerin kapsül polisakkaritlerinde oluşan presipitasyon sonucunda kapsül periferinde opak bir çerçeve oluşmakta olup kapsül şişmiş gibi görülmektedir (39). K antijenlerinin O antijenlerinin tepkimelerini engellemeleri, K antijenlerinin sayısının O antijenlerinden fazla olması ve K antijeni ile tiplendirmenin daha kolay olması nedeniyle tiplendirme esas olarak K antijenine göre yapılmaktadır. K1, K2 gibi bazı kapsül antijenleri diğerlerinden daha önemli olabilmektedir. Kapsül sentezi azottan fakir koşullarda ve optimalden düşük sıcaklıklarda (30°C) daha fazladır. Kapsülün 70'den fazla antijenik tipi

bulunmakta ve kolonilerin mukoid fenotipinden sorumlu tutulmaktadır (40,42,43).

Klebsiella'larda kapsül ve lipopolisakkaritlerde bulunan endotoksin dışında moleküler düzeyde herhangi bir virülans faktörü tanımlanmamıştır (43).

Bakteri sitoplazmik membranından kaynaklanarak dışa doğru uzanan, yapışmadan sorumlu yüzey ligantları olan fimbrialar da bakteriye adezyon yeteneği sağlayarak virulansa katkıda bulunurlar. Protein yapısında“pilin” adı verilen ve birbirleri ile sarmal şekilde birleşmiş alt ünitelerden oluşan fimbriaların oluşumu oksijen, sıcaklık, pH ve bakterilerin içinde bulunduğu ortam gibi faktörlerden etkilenir (44,46). Özellikle üriner sistem infeksiyonuna yol açan bakteriler, bu fimbrialarla konağın immun yanıtını aşabilirler (44,45).

Klebsiella'lar siderofor adı verilen demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile konak canlıdan bakteri üremesi ve invazif infeksiyon oluşumu için gerekli olan demir iyonunu temin etmektedirler (47,48).

K.pneumoniae klinik örneklerden en sık izole edilen türdür (49). Sağlıklı insanların solunum yolunda ve dışkıında %5-10 oranında, orofarinksinde ise nadiren bulunabilirken (taşıyıcılık oranı %1-6), hastanede yatan hastalarda prevalansı yaklaşık %20'lere kadar çıkar (50,51,52).

K.pneumoniae pnömoni, üriner sistem infeksiyonu, prostatit, yara yeri infeksiyonu, intravasküler ya da diğer invaziv aletlerle ilişkili infeksiyonlar, peritonit, kolesistit, enterit, menenjit, nadiren karaciğer absesi ve sepsis gibi çeşitli infeksiyonlara neden olabilir. Çoğu infeksiyon hastane kaynaklıdır veya hastaların altta yatan başka bir hastalığı bulunmaktadır (53).

Klebsiella infeksiyonları Amerika'da tüm nozokomiyal infeksiyonların %3-7'sinden sorumludur. En önemli sekiz hastane infeksiyonu etkeninden birisidir. Yapılan bir araştırmada hastanede yatan kişilerdeki üriner

infeksiyonların %9'undan ve bütün primer bakteriyemilerin %14'ünden *Klebsiella*'lar izole edilmiştir (54,55,56,57).

Alkolik, diyabetik ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda *K.pneumoniae*'ya bağlı akciğer infeksiyonlarının sık görülmesi, bu düşükün hastalardaki kolonizasyonun infeksiyon kaynağı olabileceğini destekler (58,59,60).

K.pneumoniae'nın neden olduğu lobar pnömoni tablosu sinisi başlangıçlıdır ve destrüktif seyretme eğiliminde olabilir. Geniş nekroz ve kanamayla seyredebilir. Bazı olgularda bronkopnömoni ve bronşit tablosu görülebilir. Balgam yoğun, mukoid, tuğla kırmızısı renginde veya ince, meyve jölesi görünümünde olabilir. Bazı hastalarda akciğer apsesi, ampiyem, kronik kaviter hastalık, internal hemoraji ve hemoptizi görülebilir. Çoğunlukla plevrit gelişir, bu da yaklaşık %80 hastada görülen plevral ağrıyı açıklar (36,37).

K.oxytoca izolatlarının yaklaşık yarısı dışkıdan izole edilmekte olup, sonraki en çok kaynak kan olmaktadır. *K.oxytoca* da *K.pneumoniae* gibi pnömoni, üriner sistem infeksiyonu, safra kesesi infeksiyonları, çeşitli organlarda abseler gibi değişik infeksiyonlara neden olabilmektedir, ancak daha nadir olarak görülmektedir (36).

Klebsiella ozaenae ve *K.rhinoscleromatis* ile nadir olarak karşılaşılır. *K.ozaenae*, ozena olarak adlandırılan, nazal mukoz membranların pürülan infeksiyonu olan atrofik rinitetkenidir. Pürülan akıntı pis kokuludur, hastayı ve çevresini çok rahatsız eder. Ayrıca korneal apse etkeni olduğuna dair yayınlar da mevcuttur. *Klebsiella rhinoscleromatis*, rinoskleromanın; burun, paranazal sinüsler ve üst solunum yolunun diğer kısımlarının granülatöz infeksiyonunun etkenidir. Granülomlar nedeniyle üst solunum yolunda tıkanıklıklar meydana gelebilir. Bu iki tür kültürde saptandığı zaman hastanın klinik durumuna bakılarak etken olup olmadıklarına karar verilmelidir (36).

K.granulomatis (önceden *Calymmatobacterium granulomatis* olarak isimlendirilmiştir),genital ve inguinal bölgenin granülatöz hastalığı olan

granuloma inguinalenin (Donovanozis) etkenidir. İnfeksiyon Papua Yeni Gine’de, Karayipler’de, Güney Amerika, Hindistan ve Güney Afrika ile Vietnam ve Avustralya’da endemiktir. Bulaş, seksüel temasla veya genital bölgede meydana gelen bir travma sonucu oluşur. Genital ve inguinal bölgede subkutanöz nodüller ile karakterizedir (61). *K.granulomatis* rutinde kullanılan besiyerlerinde üretilemez bununla birlikte monosit kültür sistemi ve embriyonlu yumurtada başarı ile üretilmiştir (37,40). Wright ve Giemsa ile boyanan doku örneklerinde ‘Donovan cisimcikleri’ görülmesi geçerli tanı yöntemidir. Dieterle’s, Warthin-Starry ve hızlı Giemsa boyama yöntemleri tanının özgüllüğünü arttırabilir. Genital örneklerin PCR yöntemi ile değerlendirilmesiyle de tanı konabilmektedir (37,40,61).

K.planticola ve *K.terrigena* doğada oldukça yaygın olarak bulunan türlerdir. *K.planticola* ve *K.terrigena* insan idrar, kan ve solunum yollarından izole edilmiştir. Ancak hastalık etkeni olduklarına dair bir bulguya rastlanmamıştır (37).

Klebsiella türlerinin insidansının son yıllarda artışı hem debilize hastalardaki nozokomiyal infeksiyonların artışı hem de antibiyotik direnci gelişen immünsüprese hastaların artışının sonucudur (62,63).

2.3. Bakterilerde Antibiyotik Direnci

Direnç, bir bakterinin antibiyotiğin öldürücü ya da üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir. Dirençli bir bakterinin bu özelliği değişik nedenlerden kaynaklanabilir.

2.3.1. Doğal Direnç

Bir bakteri türünün genetik özelliği olan direnci tanımlamaktadır. Doğal direnç mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı

taşınamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Bu mikroorganizmalar ilacın hedefi olan yapıyı doğal olarak içermez veya türe özgü hücre özelliklerinden dolayı ilaç etki gösteremez. *A.baumannii* ampisilin, amoksisilin ve birinci kuşak sefalosporin gibi antibiyotiklere doğal direnç gösterirken, *Klebsiella*'lar amino-penisilinlere (ampisilin, amoksisilin) ve karboksi-penisilinlere (karbenisilin, tikarsilin) doğal olarak dirençlidir (33).

2.3.2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç

Antimikrobiyal ajanın in-vivo ve in-vitro etkinliği arasındaki farkı gösteren bir tanımdır. İn-vitro etkili olarak değerlendirilen antibiyotik; dokudaki oksijen basıncı ve pH değişiklikleri veya antibiyotiğin infeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle in-vivo olarak etki göstermeyebilir. Örneğin birinci kuşak sefalosporinler kan-beyin bariyerini geçemedikleri için etken mikroorganizmaya etkili bulunsalarda menenjit tedavisinde kullanılamazlar.

2.3.3. Kazanılmış Direnç

Bakterilerin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir antibiyotikten etkilenmemesi anlamına gelmektedir ki günümüzde antimikrobiyal ilaçlara direnç denildiğinde akla bu tür direnç gelmektedir.

Bir de çoklu ilaca dirençli, pan-rezistan bakteriler gibi tanımlamalar bulunmaktadır. “Çoklu ilaca direnç” terimi, üç veya daha fazla ilaç grubuna karşı direnci göstermek için kullanılmaktadır. Bu durum bakterilerin, yapısı ve antibakteriyel etki mekanizması farklı birçok ilaca karşı kazandığı direnç durumudur. Çoklu direnç, genellikle bakterinin kromozomlarında ve özellikle plazmidlerinde birden fazla türde direnç geninin bulunmasına bağlıdır. “Pan-rezistan” terimi ise test edilen tüm standart antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olansuşları açıklamak için kullanılmaktadır (64).

Sonradan kazanılan direnç ya biyokimyasal mekanizmalarla ya da genetik mekanizmalarla olmaktadır.

2.3.3.1. Biyokimyasal mekanizmalar

İlacın hedefinde değisiklik oluşması, reseptörün affinitesinde azalma olması, ilaçtan etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması, sentezlenen enzimlerle ilacın inaktive edilmesi, hücreye giren ilaç miktarının azaltılması, permeabilitenin azaltılması, aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması gibi mekanizmalardan bir veya birkaçını kullanarak bakteriler farklı etkimekanizmalarına sahip antibiyotiklere direnç kazanabilmektedir (61).

2.3.3.2. Genetik mekanizmalar

DNA'daki mutasyonlar ya da yeni bir DNA dizini edinilmesi antibiyotik direncine neden olur (65).Genetik mekanizmalarla direnç kazanılması; kromozomal genlerde mutasyon oluşması, direnç genlerinin dışarıdan alınması, dışarıdan alınan genlerde mutasyon oluşması gibi mekanizmalarla olmaktadır (66).

2.3.3.2.1. Kromozomal Genlerde Mutasyon Oluşması

Antibiyotiklerin çoğunlukla bakteri hücreesindeki hedefleri, hücrenin üremesi ve devamı için yaşamsal önemi olan proteinlerdir. Bu proteinler hücredeki genler tarafından kodlanmaktadır. Bu genler bakterinin kromozomlarında yer almaktadır. Bakteri hücresinin metabolik ara ürünleri ve bazı çevresel faktörlerle kromozomda spontanbir mutasyon oluşması sonucu bakteri hücresinde yapısal değişiklikler oluşabilir ve hücre içinde ilacın hedefinde değişiklik olabilir (66,68).

Ortamda antibiyotik bulunduğunda, duyarlı organizmalar baskılanacağı için ilaca dirençli olanlar yararına bir seleksiyon oluşacaktır. Ancak spontan mutasyon oluşma olasılığı normal koşullarda çok düşüktür. Bir bakteri hücrelerinde tek bir genin kendiliğinden mutasyona uğrama oranı 10^{-5} ile 10^{-10} civarındadır ve bu nedenle klinikte bu tip direnç nadirdir (67).

Antibiyotiğin hedefinden başka bakterideki düzenleyici genlerde de mutasyon oluşabilmektedir. *Enterobacter spp.*'de kromozomal beta-laktamaz üretiminin artışı bu tip dirence örnektir (66).

2.3.3.2.2. Direnç Genlerinin Dışarıdan Alınması

Antibiyotiklere duyarlı olan bakteriler direnç genlerini bu genleri taşıyan bakterilerden çeşitli yollarla alabilirler. Bu genlerin aktarımı en sık kromozomdan bağımsız olarak replike olan, halka yapısında DNA parçaları olarak bilinen plazmidler yoluyla olmaktadır. Bu kromozom dışı replikatif DNA şekilleri birçok geni kodlayabilmektedirler. Klinikte görülen direnç daha çok plazmidlere bağlıdır. "R plazmidi" adı verilen direnç plazmidleri farklı antibiyotiklere karşı direnç genleri taşımaktadır. R plazmidi içeren bakteriler bu özelliklerini duyarlı bakterilere aktararak onların da dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Antibiyotik kullanımı, direnç genlerini taşıyan bakteriler yararına bir seleksiyona yol açmakta, özellikle hastaneler gibi antibiyotik kullanımının yoğun olduğu yerlerde dirençli bakteriler artış göstermektedir (67,69).

Plazmidler arasında da gen aktarımı olabilmektedir. Bu da bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizileri olarak bilinen transpozonlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bunların plazmidlerden farkı bağımsız olarak replike olmamalarıdır. Bu nedenle kromozom veya plazmid içinde bulunmakta, bunlar arasında yer değiştirebilmektedirler. R plazmidlerinin ortaya çıkışında ve bir bakterinin çok kısa sürede birçok

antibiyotige çoklu dirençli duruma gelişinde bunların rolü olduğu düşünülmektedir (67,68,69).

Transpozonlar ve plazmidler, *Acinetobacter* türlerinin biyolojisinde önemli roloynarlar. *Acinetobacter*lerin %80 oranında çeşitli molekül büyüklüklerinde çok sayıda plazmid taşıdıkları bildirilmiştir. Kromozomda lokalize transpozonlar aracılığıyla çoğul antibiyotik direnç geninin taşındığı bildirilmiştir (21,70).

2.3.3.2.3. Dışarıdan Alınan Genlerde Mutasyon Oluşması

Bu mekanizmaya en iyi örnek genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleridir. GSBL'lerin plazmid kontrolünde sentezlenen TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi penisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere dirençten sorumlu beta-laktamazlardan nokta mutasyonları sonucu 1-4 aminoasit değişikliği ile ortaya çıktıkları ve bu enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları belirlenmiştir (71,72,73). Plazmidler aracılığıyla da aktarılabilen bu enzimler son yıllarda giderek artan oranlarda karşımıza çıkmakta ve gram negatif bakteriler arasında özellikle *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarında yaygın olarak görülmektedir. Toplum kaynaklı suşlardada hastane kaynaklı suşlar kadar olmasa da oldukça yüksek oranlarda GSBL bildirilmektedir (74).

2.4. *Acinetobacter* ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler ve Bu Antibiyotiklere Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar

2.4.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam grubunda; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, bir monobaktam olan aztreonam ve beta-laktamaz inhibitörleri yer almaktadır. Bu antibiyotiklerin ortak özellikleri; yapılarında beta-laktam halkası adı verilen 4 atomlu bir halka taşımalarıdır. Antibiyotiklerin kendi özellikleri ise bu

halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlarda beta-laktam halkasına bağlanan başka bir yapı yoktur.

Beta-laktam antibiyotiklerin hedefi, bakterilerin sitoplazmik membranında bulunan ve hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayan proteinler (PBP)'dir (36,73,75). PBP'ler hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresini katalize eden karboksipeptidaz ve transpeptidaz enzim aktivitesi gösterirler. Beta-laktam antibiyotikler penisilin bağlayan proteinlere bağlanınca peptidoglikan sentezlenemez, dolayısıyla hücre duvar yapısı bozulur ve osmotik direnci bozulan bakteri hücresi lizise uğrar. Dolayısıyla bakterisidal bir etki ortaya çıkar (36). Beta laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanabilmeleri için gram negatif bakterilerin dış membranındaki “porin” adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamaz enzimlerinden etkilenmemeleri gerekmektedir (36).

2.4.1.1. Penisilinler

Penisilin grubu antibiyotiklerin temel kimyasal yapısı, bir beta-laktam halkası, bir tiazolidin halkası ve bir yan zincirden oluşur. Tiazolidin halkasına bir karboksil, beta-laktam halkasına bir amin grubu bağlanır. Bu yapının bütünlüğünün bozulmamış olması antibakteriyel etki için gereklidir. Bu yapıda antibakteriyel etkiyi beta-laktam halkası sağlar. Amino-açıl yan zincirindeki değişiklikler ise spektrum, absorpsiyon ve beta-laktamaz duyarlılığı gibi antibakteriyel etki spektrumunu ve farmakolojik özellikleri belirler (76,79).

Doğal penisilinler ve penisilinaza dayanıklı penisilinler gram-pozitif bakterilere etkilidirler. Aminopenisilinlerin etki spektrumu penisilin G'ye benzer. Kendi üyeleri arasında da etkinlik açısından farklılık yoktur. *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* türleri ve *Bacteriodes fragilis*'lerin çoğu penisilinlerin bu sınıfına dirençlidir (77). Her ne kadar

toplum kökenli *E.coli*'lerin çoğu aminopenisilinlere duyarlı ise de hastane kökenlerinde plazmidlerle yayılan direnç yaygındır. Tüm aminopenisilinler gram negatif ve gram pozitif bakterilerin beta-laktamaz enzimlerine duyarlıdır. Bugün için gram negatif basil infeksiyonlarında aminopenisilinler ampirik olarak seçilmemelidir (78).

Pseudomonas'lara etkili penisilinler, *P.aeruginosa*'yı da içine alan pek çok aerob gram negatif basile etkili olan ilaçlardır. Hepsinin gram pozitif bakterilere etkinlikleri, penisilin G ve aminopenisilinlerden daha azdır. Geniş spektrum gösteren karboksi ve üreidopenisilinlerin gram negatif basiller üzerine etkinliği ise aminopenisilinlerden daha fazladır. Tikarsilin ile karbenisilinin etkisi benzerdir, fakat tikarsilinin etkin dozu daha düşüktür. Piperasilin ve azlosilin psödomonaslar ile gram negatif anaeroblara karşı yüksek aktivite gösterirler (76,79). Bu grup penisilin türevleri beta-laktamazlara dirençli değildir (80).

i) Karboksipenisilinler (Karbenisilin ve tikarsilin): Yan zincir olarak bir karboksil grubunun penisilin temel bileşiğinde bulunduğu gruptur. Hücre duvarından geçirgenlikleri artmış olduğundan gram-negatif bakterilerden daha fazlasına etki gösterirler. Antipsödomonal etkinlikleri yanında *Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella*, indol pozitif *Proteus* türleri gibi bakterilere de etkilidirler (79). Bunlar içerisinde tikarsilinin beta-laktam inhibitörlü kombinasyonları *Acinetobacter* suşlarına karşı etki gösterebilmektedir (81).

ii) Üreidopenisilinler (Azlosilin, mezlosilin ve piperasilin): Antipsödomonal etkinliği karboksi penisilinlerden daha fazladır. Piperasilin *Acinetobacter* kökenlerine karşı etkinlik göstermektedir. Tazobaktam ile kombine edilebilir (82). Piperasilin/tazobaktam 8/1 oranında kombine edilerek kullanılır (81).

2.4.1.2. Sefalosporinler

Penisilinlerden beş üyeli tiazolidon halkası yerine, sefem çekirdeği adı verilen altı üyeli dihidrotiazin halkasının olmasıyla ayrılırlar. *Cephalosporium* türü mantarlardan elde edilen üç aktif fermentasyon ürününün biri olan sefalosporin-C türevi ilaçlardır (83). Dihidrotiazin halkası sefalosporinlerin beta-laktamazlara karşı daha stabil olmasını sağlar. Sefem çekirdeğinin yedinci pozisyonundaki değişiklikler antibakteriyel etkiden, üçüncü pozisyonundaki değişiklikler ise farmakokinetik ve metabolik özelliklerden sorumludur (84). Penisilinler gibi penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak hücre duvar sentezini önler ve bakterisidal etki gösterirler. Sefalosporinler yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak ve beşinci kuşak olmak üzere beş gruba ayrılırlar. Kuşak sayısı arttıkça gram-pozitif etkinlik azalırken, gram negatif etkinlik artmaktadır (85).

Birinci Kuşak Sefalosporinler: Sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefalekssin, sefapirin, sefradin, sefadroksil, sefasetril, seftezol.

İkinci Kuşak Sefalosporinler: Sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan.

Üçüncü Kuşak Sefalosporinler: Sefotaksim, seftizoksim, sefoperazon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksim, sefpiramid.

Dördüncü Kuşak Sefalosporinler: Sefepim, sefpirom.

Beşinci Kuşak Sefalosporinler: Seftobiprol, Seftarolin.

Birinci kuşak sefalosporinler gram pozitif koklara çok etkilidirler. İkinci kuşak sefalosporinler gram negatif bakterilere, özellikle *Proteus spp.* Ve *Enterobacter spp.* üzerine biraz daha fazla etkilidirler. Üçüncü kuşak sefalosporinler *Enterobacteriaceae*'ya ikinci kuşaktan daha fazla etkilidirler.

Parenteral uygulanan birinci kuşak sefalosporinlerin etkinlikleri birbirine benzerdir. Yalnızca sefazolinin stafilokoklara etkinliği biraz daha az, gram negatif etkinliği diğer birincikuşaküyelerine göre biraz daha fazladır. Birinci kuşak sefalosporinlerden herhangi birisi in-vitro antibiyotik duyarlılık testinde diğerlerinin yerine kullanılabilir.

İkinci kuşak sefalosporinler, birinci kuşağa göre stafilokok ve streptokoklara daha az, gram negatif basillere ve anaeroblara daha fazla etkilidir. Sefoksitin, gram negatif basillerin ürettiği bazı beta-laktamazlardirençlidir ve bazı *Enterobacteriaceae*'lar tarafından üretilen beta-laktamazlarınoldukça etkili indükleyicisidir (85).

Üçüncü kuşak sefalosporinler gram negatif basillere karşı yaygın olarak kullanılan sefalosporinlerdir. *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, indol pozitif *Proteus spp.*, *Providencia spp.* ve *Serratia spp.*'ya karşı etkilidirler. İkinci kuşaktakilerden klinik yönden en önemli farkları gram negatif basillere ve *Neisseria* türlerinekarşı daha güçlü etkinlik göstermeleridir. Gram pozitif koklara özellikle *S.aureus*'a karşı etkileri birinci kuşağa oranla çok zayıftır. Anaeroblara karşı etkileri değişik derecededir (86).

Dördüncü kuşak sefalosporinlerin gram pozitif koklara ve gram negatif enterik bakterilere etkinliklerinin yanısıra antipsödomonal etkileri de bulunmaktadır (84). Özellikle sefepim *Acinetobacter* infeksiyonlarında etkilidir (83).

i) Seftazidim: Aminotiazolil grubu yarı sentetik bir üçüncü kuşak sefalosporindir. Tüm vücut sıvılarında dağılımı oldukça iyidir. Antipsödomonal etkinliği ön plandadır. Duyarlı *Acinetobacter* infeksiyonlarında kullanılabilir. Ancak son zamanlarda yüksek direnç oranları bildirilmiştir (83,87).

ii) Sefepim: Dördüncü kuşak yarı sentetik, parenteral kullanıma uygun çiftiyonik karekterde aminotiazolil sefalosporindir. Aminotiazolil grubunun varlığı gram negatif etkinliği ve beta-laktamazlara direnci sağlayan bir özelliktir. Üçüncü karbon atomunda N-metilpirolidin bulunması da gram

negatif hücre duvarından geçebilme ve beta-laktamaz direnci özelliği sağlar. *Pseudomonas* kökenleri de dahiltüm gram negatif basillere, gram pozitif koklara ve anaeroplara karşı etkilidir. Tip 1 kromozomal beta-laktamazlardan daha az etkilenmesi nedeni ile gram negatif enterik basillere üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha etkilidir (83,84).

iii) Seftobiprol: Seftobiprol molekülünde sefem nükleusunun yedinci ve üçüncü pozisyonlarındaki maddeler sırasıyla beta-laktamaz stabilitesini ve PBP'lere affiniteyi artırır. Seftabiprol streptokoklardaki beta-laktam direncinden sorumlu PBP2x'e de bağlanır (88).

Geniş spektrumlu bir beta-laktam olan seftobiprol, metisilin dirençli *S.aureus*'a, penisilin dirençli pnömokoklara, vankomisine dirençli *S. aureus*'a ve koagülaz-negatif stafilokoklara karşı aktiftir (88).

Gram-negatif bakterilerde seftazidime duyarlı *P.aeruginosa* suşlarına karşı bakterisidaldir, seftazidime dirençli olanlara karşı aktivitesi iyi değildir. Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretmeyen *E. coli* ve *Klebsiella* suşlarına etkindir, ancak GSBL üreten suşlarda aktivitesi iyi değildir. *Salmonella*, *Neisseria*, *H.influenzae* ve *M.catarrhalis* suşlarına karşı etkilidir. Seftobiprolün *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'ya karşı da aktivitesi iyi değildir (88,89).

2.4.1.3. Beta-laktamaz inhibitörleri

Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevleri ya da üçüncü kuşak sefalosporin olan sefoperazonun aynı preparat içinde birleştirilmesi ile beta-laktamaz salgılayan bakterileri de etki spektrumuiçine alan beta-laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler geliştirilmiştir. Beta-laktamaz inhibitörleri yapıları gereği bakterilerin

peptidoglikan tabakasını oluşturan PBP'lere benzerler. Üç molekül de beta-laktamaz inhibisyonunda irreversibl inhibitör olarak davranır. Pasif kovalent inhibitör olarak da gruplandırılan bu bileşikler beta-laktamazlar ile inaktif yeni molekül oluşturmak üzere birleşir. Ancak bu inhibitörler tüm beta-laktamazları inhibe edemez. Bunların hiçbirisi *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarında bulunan kromozomal beta-laktamazları inhibe edemez. Builaçlar genellikle *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacteriodes*, *Klebsiella* türleri ve *E.coli*'nin daha çok plazmid kökenli basit beta-laktamazlarını inhibe ederler (82,90,91). Beta-laktamaz inhibitörleri arasında sulbaktam pek çok *Acinetobacter* türüne karşı intrensek aktiviteye sahiptir.

i) Sulbaktam: Yarı sentetik bir bileşik olup, kimyasal olarak penisillanik asit sulfon olarak adlandırılır (92). Çeşitli gram pozitif ve gram negatif aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar tarafından üretilen beta-laktamazların spesifik inhibitörüdür. Bu inhibitör başta *Bacteroides* türleri olmak üzere *Citrobacter diversus*, *Klebsiella* türleri, *Proteus vulgaris*'in kromozomal enzimlerini, stafilokokların sentezlediği betalaktamazları ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları inhibe eder. Bazı sınıf D türü beta-laktamazların yanı sıra, *M.morganii*'nin sınıf C kromozomal beta-laktamazı da sulbaktam tarafından inhibe edilir (92,93). Sulbaktam bakterilerde kromozomal beta-laktamaz indüksiyonuna neden olmaz (92).

Sulbaktam, gram-negatif bakterilerde PBP2'ye bağlanarak inhibisyona yolaçar. Bu özellik tek başına antibakteriyel etkinliğe yol açmamakla birlikte penisilin veya sefalosporinlerle kombine edildiğinde antibakteriyel etkinliğin güçlenmesine neden olmaktadır. Sulbaktam tek başına *B.fragilis* ve *Acinetobacter* spp.'ye direkt antimikrobiyal etki gösterir (94).

Ampisilin-sulbaktam: Ampisilin ile beta-laktamaz inhibitörü olansulbaktamın kombinasyonudur ve 2:1 oranında ampisilin ve sulbaktam içerir. Yapısal olarak bakterilerin hücre duvar sentezinde rol alan disakkarid peptidlerin karboksi terminali ile benzerlik gösterir. Bu benzerlik nedeniyle

penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak hücre duvar sentezi inhibisyonu yaparak, bakterisidal etki gösterir. Ampisiline sulbaktam eklenmesi, dar spektrumlu ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapan ve ampisiline dirençli olan gram negatif, gram pozitif ve anaerob bakterilere karşı etkinliğini arttırır (94).

Sefoperazon- sulbaktam: Sefoperazon yarı sentetik, antipsödomonal etkili bir üçüncü kuşak sefalosporindir. Beta-laktamaz sentezlemeyen enterik gram negatifler ve *P.aeruginosa*'ya karşı yüksek aktivite gösterir. Ancak bu mikroorganizmalar çoğunlukla çeşitli beta-laktamazlar sentezleyerek sefoperazona karşı direnç geliştirirler (83,92). Özellikle enterik gram-negatif mikroorganizmaların ve *P.aeruginosa*'nın beta-laktamaz üretimiyle sefoperazonun etkinliğini belirgin derecede azaltmasının önüne geçmek için, sefoperazon sulbaktam ile kombine edilerek kullanıma sunulmuştur. Ülkemizde sefoperazon ve sulbaktam kombinasyonu, içinde her iki etken maddenin de 1'er gramını içeren 1:1 kombinasyonu şeklinde bulunmaktadır. Sefoperazon, sulbaktam ile kombine edildikten sonra beta-laktamaz üreten pek çok mikroorganizmaya karşı yeniden etkin hale geçer (92).

Sefoperazon-sulbaktamın in vitro etkinliğini değerlendirmek için yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada *Acinetobacter calcoaceticus* suşlarının %95'nin sadece ≤ 8 µg/ml sulbaktam ile inhibe edilmiş olduğu belirlenmiştir. Bu durum sulbaktamın bu suşlara karşı tek başına antibakteriyel etki görmesiyle açıklanmıştır. Çıkarılan diğer bir sonuç ise, sulbaktam sefoperazonla kombine edildiğinde; *A.calcoaceticus* suşlarının %99'unun sefoperazona karşı duyarlılığında görülen artış olmuştur (92,95).

2.4.1.4. Monobaktamlar

Aztreonam ilk sentetik monobaktam antibiyotiktir. Beta-laktamhalkasına birleşik bir başka halka içermemelerinden dolayı penisilin ve sefalosporinlerden ayrılırlar. Aztreonam, gram negatif bakterilerde PBP3'e

bağlanarak duvar sentezini bozar. Gram pozitif bakterilerin PBP'sine bağlanamaz. Anaerob bakterilerin PBP'sine de düşük affinite gösterir. Bu yüzden etki alanı gram negatif aerob bakteriler ile sınırlıdır. *K.pneumoniae*, *H. influenzae*, *M.catarrhalis* gibi sık rastlanan gram negatif patojenlere etkilidir (96).

Gram negatif bakteriler başlıca üç yolla beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirirler.

i) Penisilin bağlayan proteinler (PBP)'de oluşan değişiklikler:

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşturan PBP değişiklikler; PBP'nin aşırı sentezi, düşük afiniteli başka bir PBP edinilmesi, duyarlı bir PBP'nin daha dirençli olanlar ile rekombine olması ve PBP afinitesinde azalmaya yol açacak nokta mutasyonlarından oluşur. Bu mekanizma daha çok gram pozitif bakterilerde görülmektedir, gram negatif bakterilerde nadirdir (97). *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* ve *Streptococcus pneumoniae*'de gözlenen penisilin direnci ile metisiline dirençli *S.aureus*'da görülmekle beraber *Acinetobacter* türlerinde de tanımlanmıştır (98). PBP'lere afinite azalması *Acinetobacter* türlerinde önemli bir direnç gelişme mekanizmasıdır (99).

ii) İlacın girişinin engellenmesi ve atım pompaları: Beta-laktamların çoğu suda eriyebilen moleküllerdir. Bu nedenle lipid yapıdaki gram negatif bakteri dış membranını geçemezler. Bu geçiş ancak dış membrandaki porin proteinlerinin oluşturduğu, içleri su dolu kanallıklar aracılığıyla gerçekleşir. İn-vitro koşullarda porin proteinlerini kaybetmiş mutantların kısa sürede elde edilebilmesine karşın porin eksikliği olan gram negatif bakteri mutantları klinikte nadirdir (73).

Beta-laktam antibiyotikler en çok dış membranda yer alan iki porin proteini olan C ve F'nin yer aldığı başlıca iki porini kullanırlar. İmipenem ise D2 proteininin yer aldığı başka bir porini daha kullanır. Dolayısıyla gram negatif bakteriler Porin C ve F proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken imipeneme duyarlı kalabilirler. Bazı *P.aeruginosa* ve

Enterobacter suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir. Ancak bu tipte direnç geliştiren bakteriler diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı çapraz direnç göstermezler (97,100).

Bakterilerdeki porinlerin sayısı ve özellikleri ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemekte önemlidir (97). *Acinetobacter* kökenlerinde dış membran geçirgenliği *Escherichia coli*'nin %1-3'ü kadardır. Protein 1 ve 2 *A.baumannii*'nin dış membran porinlerini oluşturmaktadır (101). *A.baumannii*'nin porin kanalları iyi karakterize edilmediği halde, bakteriyel porin proteinlerinin sentezinin azalması veya mutasyonları ile antibiyotik direnci ortaya çıkabilmektedir (102). Yapılan çalışmalarda *carO* tarafından kodlanan 29 kDa'luk dış membran proteininde azalma karbapenem direncinde önemli rol oynamaktadır (103).

Antibiyotiklerin bakteri hücrelerinden atılımı, bakterilerin antibiyotiklerin hücre içi yoğunluğunu azaltmak için kullandıkları enerjiye bağımlı bir mekanizmadır. Atım pompaları antibiyotiklere duyarlı ve dirençli tüm mikroorganizmalarda bulunmakta, mutasyonlar sonucunda antibiyotiklere direnç oluşturmaktadır (97,104).

Çoklu ilaca dirençten sorumlu olan atım pompaları son yıllarda *Pseudomonas spp.*, *E.coli* ve *Acinetobacterspp.* gibi bakterilerde özellikle hastane infeksiyonu olan etkenlerde sıklıkla görülen, sadece antibiyotiklere değil, antiseptikler ve dezenfektanlar gibi yapısal olarak birbirinden farklı bileşikler tanıyarak hücreden atan membran transport proteinleridir. *Acinetobacter*'de klinik dirençoluşturmak için atımpompaları genelde AmpC beta-laktamazlarının veya karbapenemazların aşırı ekspresyonuyla bağlantılı olarak etki eder. Atım pompaları, beta-laktam antibiyotikleri uzaklaştırmanın yanı sıra kinolonları, tetrasiklinleri, kloramfenikölü, dezenfektanları ve tigesiklini etkin biçimde dışarı atar (104,105,106,107).

iii) Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi: Beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençte bakterilerin en sık kullandığı mekanizma beta-

laktamaz enzimleri ile antibiyotiklerin inaktive edilmesidir. Beta-laktamazlar gram negatif bakterilerde dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunurlar. Kromozom veya plazmid kontrolünde sentezlenirler. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimleri gram-pozitif bakterilere göre daha çok yaygın ve çeşitlidir. Bunun nedeni de birçoğunun plazmid ve transpozon kontrolünde olması ve direnç genlerinin duyarlı bakterilere geçirilebilmesidir (93,97,108). Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır (109).

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak beta-laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Yapısal olarak PBP'lere benzerler. Beta-laktamazlar; gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram pozitif bakteriler arasında beta laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır (110). Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta-laktamazları esas olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes*'ler tarafından üretilen beta-laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinaz etkinliği göstermektedir. Gram negatif bakteriler, daha çok sayıda beta-laktamaz üretirler. Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir (111).

Normalde bakteriler tarafından baskılayıcı bir mekanizma ile bu enzimler düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde (örneğin ampisilin, birinci kusak sefalosporinler) gram negatif bakterilerin kromozomal beta-laktamazlarının enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir (İndüksiyon). Yani gram negatif bakterilerin kromozomal beta-laktamazları "indüklenebilir" özelliktedir. Ancak, indükleyici beta-laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski bazal beta-laktamaz sentezine geri döner. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir dirençten söz edilemez. İndüklenebilir beta-laktamaz taşıyan gram negatif popülasyondaki bazı mutant bakteriler, yüksek miktarda beta-laktamaz sentezleyebilirler. İşte esas sorun bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen bu mutant suşlar nedeniyle oluşur. İndüklenebilir kromozomal

beta-laktamaz taşıyan gram negatif bakterilerde normalde 10^{-5} - 10^{-7} arasında bir sıklıkla beta-laktamaz sentezi indüklenemeyen konstitütif mutantlar bulunur. Eğer bakteri popülasyonundan bu tipteki bakteriler seleksiyona uğrayacak olursa klinikte ciddi direnç sorunu ortaya çıkar. Fazla miktarda sentezlenen beta-laktamaz taşıyan bu tip bakteriler imipenem dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere ve beta-laktamaz inhibitörlerine (sulbaktam ve klavulonik asit gibi) dirençlidirler. Bu mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi devamlı ve yüksek düzeyde olmaktadır. Böyle bakterilerle oluşan infeksiyonların indükleyici bir antibiyotik ile tedavisi sırasında bir süre sonra duyarlı bakterilerin tamamı ölürken infeksiyon ortamında sadece dirençli mutantlar kalır (Seleksiyon). Bu mutantlar hızla çoğalarak baştan tedaviye yanıt vermiş gibi görünen infeksiyonun tedavisinde başarısızlığa neden olurlar (112).

Beta-laktamazlar çeşitli yöntemlere göre sınıflandırılmıştır. Ambler beta-laktamaz enzimlerini kodlayan nükleotid dizilerine dayanan, moleküler bir sınıflandırma yapmıştır. Bush, Jacoby ve Mederios ise beta-laktamazları substrat profilleri, biyokimyasal özellikleri ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarını temel alarak işlevsel özelliklerine göre 4 gruba ayırmıştır. Her iki sınıflandırma birleştirilerek Tablo 2'de sunulmuştur (93).

Ambler sınıflaması: Ambler sınıfına göre beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfta toplanmaktadır. A, C ve D sınıfları aktif bölgelerinde serin, B sınıfı ise çinko içermektedir (93,99).

Sınıf A enzimleri çoğunlukla plazmid kontrolünde olan penisilinazlardır. B sınıfındaki enzimler ise çoğunlukla karbapenem grubu antibiyotiklere karşı etki gösteren karbapenemazlardan oluşan metallo-beta-laktamazlardır (99). D sınıfı enzimler oksasilinazlardır.

Tablo 2. Beta-laktamaz enzimlerin sınıflandırılması

Beta-laktamaz grubu	Alt grup	Molekül sınıfı (Ambler)	Özellik
1		C	Çoğunlukla gram negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler, ancak plazmidle de kodlanabilir. Karbapenemler dışındaki tüm beta-laktamlara direnç oluştururlar. Klavulanik asitle inhibe olmazlar.
2		A, D	Birçoğu klavulonik asitle inhibe olur.
	2a	A	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Çoğunlukla gram negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, SHV-1)
	2be	A	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar
	2br	A	İnhibitörlere dirençli TEM beta-laktamazlar; bir tane SHV türevidir
	2c	A	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	Oksasilini hidroliz eden enzimler, klavulanik asitle az inhibe olur.
	2e	A	Klavulanik asitle inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulonik asitle inhibe olan enzimler
3	3a, 3b, 3c	B	Karbapenemler ve monobaktamlar dışındaki beta-laktamlara direnç oluşturan metallobeta-laktamazlar. Klavulanik asitle inhibe olmazlar.
4		Bilinmiyor	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmiş enzimler.

*93 numaralı kaynaktan alıntılanmıştır.

C sınıfındaki enzimler sefalosporinazlardır ve çoğunlukla kromozom kontrolündedir. Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılırlar. *Acinetobacter* türlerinde bulunan kromozomal enzimlerin büyük çoğunluğunu bu enzimler oluşturmaktadır. Bu

beta-laktamazlar penisilin ve sefalosporinlere direnç gelişiminden sorumludur. Genelde bu tür beta-laktamazlar, klinik olarak fark edilebilir dirence neden olmayan düşük düzeyde bir salgılanmaya sahiptir. Bununla birlikte, AmpC geninin yanında bir promotor insersiyon dizisi olan ISAba1'in eklenmesi, beta-laktamazların üretimini artırarak, sefalosporinlere karşı tedaviyi sınırlandıran bir dirence neden olur (99,113). Yapılan çalışmalarda *A.baumannii* suşlarının %98'inde sefalosporinaz aktivitesi saptanmıştır (115).Yeni tanımlanan sınıf C enzimler günümüzde *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak adlandırılırlar (*Acinetobacter* Derived Cephalosporinases (ADCs)) ve yeni yapılan çalışmalarda yedi adet ADC AmpC geni tanımlanmıştır (114,115).

Bush, Jacoby ve Mederios sınıflaması:

Grup 1: Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta-laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapeneme karşı da duyarlıdırlar (93, 109).

Enterobacter spp., *P.aeruginosa*, *C.freundii*, *Serratia spp.*, *Morgenella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'deki sentezlenen kromozomal beta-laktamazlar indüklenebilen türdendir (111,112).

Grup 2: En geniş kategoriye oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküller sınıf olarak A ve D'de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar. 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar (93,99,111,109,116).

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *S.aureus*'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *B.cereus*'un kromozomal beta-laktamazları da bu gruptadır (93, 99, 111, 109).

2b: Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazları içerirler (93, 99, 111, 109).

Plazmid kontrolündeki “geniş spektrumlu” TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. TEM-1 beta-laktamazı özellikle *E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K.pneumoniae* suşlarında bulunur (111,109,116).

2be: Oksimin beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, seftaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM ve SHV enzimleri gelişmiştir (93,99,111,112). Bunlar grup 2be’de yer almakta ve genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz olarak adlandırılmaktadır. Klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır (118). Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye’den izole edilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır (117).

2br: Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu gruba alınmıştır. TEM-30’dan TEM-36’ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır (93, 99, 111, 109, 118).

2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M.catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V.cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır (93, 99, 111, 109).

2d: Bu grup, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşda saptanmıştır (93, 109). Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır (93, 109, 119).

2e: Bu grupta yer alan beta-laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B.fragilis*'in CepA enzimi, *E.coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S.maltophilia*'nın L2 ve *Y.enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır (93, 111, 109, 119).

2f: Bu grupta, *E.cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E.cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S.marcescens*'in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (93, 111, 109, 118, 119).

Grup 3 (Metallo-beta-laktamazlar): B sınıfı olan bu beta-laktamazlar, monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidrolize ederler. Sıklıkla etki spektrumlarını genişletecek bir diğer enzimle birlikte üretilirler. Diğer enzimlerden farklı olarak aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunur. Beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler fakat EDTA ile inaktive olurlar. 3 alt gruba bölünmüşlerdir. 3a'da genellikle penisilinleri karbapenemlerden daha hızlı hidrolize eden IMP-1-8 ve VIM-1-3 enzimleri yer alır. 3b'de *Aeromonas*'ın gerçek karbapenemazları, 3c'de sadece *Legionella gormanii*'nin yüksek sefalosporinaz aktivitesi olan metalloenzimleri yer alır. *Acinetobacter* türlerinde de karbapenem ve yeni kuşak

sefalosporinleri hidrolize eden metallo-beta-laktamazlar tanımlanmıştır (IMP, VIM). Bu enzimler plazmidlerce kodlanırlar (93,99,111,109,118).

Grup 4: Bu grup, klavulanik asit ile pek de iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinaz grubundan oluşur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *A.faecalis*, *B.fragilis*, *C.jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazu bu gruba sokulmuştur (93,99,111,109).

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar: Beta-laktamaz enzimlerin yarısından fazlasını sayıları 200'ü aşan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam gibi oksimin beta-laktam ajanları hidrolize eden genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar oluşturur (118).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, moleküler sınıflamaya göre sınıf A ve D'de, Bush, Jacoby ve Mederios'a göre ise grup 2be, 2d ve 2e'de yer alan beta-laktamazlardan oluşur (120,121). Geniş spektrumlu penisilinlere, üçüncü kuşak sefalosporinlere ve kısmen sefepime etkili; karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler. Plazmid aracılı enzimler oldukları için gram negatif bakterilerin değişik türleri arasında transfer edilebilirler (120,121). Bu plazmidler aynı zamanda aminoglikozidler, kloramfenikol, sulfonamidler, trimetoprim ve tetrasiklin gibi antibiyotikler için de direnç genleri taşımaktadırlar. Bu nedenle bu plazmidleri bulunduran bakteriler birçok ilaca dirençli olmaktadır (119).

GSBL üreten kökenlerde infeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz kateter gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır. Hastane infeksiyonu etkeni olarak görülme sıklığı giderek artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle yol açmaktadır (123,124).

GSBL'lar ilk olarak 1983 yılında Avrupa'da *K.pneumoniae* ve *S.marcescens* izolatlarında, daha sonra da 1989 yılında Amerika'da *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında tanımlanmıştır (111, 125). En sık *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*'da görülmekle birlikte *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.* gibi enterik bakterilerle *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi nonfermentatif bakterilerde de görülebilmektedir (125). GSBL üreten bakteriler, hızla yayılmakta ve hastanelerde salgınlara yol açabilmektedir. Görülme oranı giderek artmakta olan GSBL'ler klinikte ciddi sorunlara ve tedavi başarısızlıklarına yol açmaktadır (125).

Klasik olarak tanımlanan GSBL'lerin büyük çoğunluğu sınıf A'da yer alan TEM, SHV ve sınıf D'de yer alan OXA enzimlerinden köken almakla birlikte son yıllarda CTX-M türü enzimlerin de sıklığı artmaya başlamıştır. Bunların dışında PER, VEB, GES, TLA, BES gibi birçok GSBL enzim türü vardır (126,127).

TEM Grubu GSBL'ler: TEM-1 gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampiciline dirençli *E.coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimlerdir; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Ancak oksiminino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur (121,128,129).

TEM grubu beta laktamazlar, *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. Nadir de olsa *P.aeruginosa*'da da bildirilmiştir (121,128,131). Ambler sınıf A'da yer alan TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazların varlığı *Acinetobacter* türlerindeki beta-laktam direncinden büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır (132).

Nükleotid dizilerinin incelenmesi sonucu TEM beta-laktamazlardaki mutasyonlar ile GSBL'lerde olduğu gibi yeni beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli varyantların (inhibitör rezistan TEM, IRT) oluştuğu belirlenmiştir.

TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT'ler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir, buna karşın TEM veya SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'ler ile birlikte ele alınmaktadır. Bu enzimler önceleri inhibitör rezistan TEM (IRT) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra TEM ya da SHV'de sıralamaya girmiştir. Örneğin; IRT-1 TEM-31, IRT-2 TEM-44, IRT-3 TEM-32, IRT-4 TEM-45 olarak yeniden numuralandırılmıştır. IRT'ler en sık olarak *E.coli*'de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir (133, 134).

SHV Grubu GSBL'ler: Bu enzimlerin öncüsü olan SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'da bulunmaktadır. Genellikle kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır. Oksiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (30). SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*'dan başka *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir (121,128,135,136).

OXA Grubu GSBL'ler: Ambler sınıf D'de yer alan ve daha çok *P.aeruginosa*'da bulunan GSBL'lerdir. Bu enzimlerin OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler (121,128). TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (121,128). OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (128,130). İmipeneme dirençli *A.baumannii* kökenlerinde kromozomal OXA-24 enziminin varlığı gösterilmiştir. OXA-24 GSBL değildir ancak karbapenemaz aktivitesi göstermektedir (128, 137).

CTX-M Grubu GSBL'ler: Bu grup substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir (128). *Klyvera ascorbata*'nın kromozomal AmpC beta-laktamazından köken aldığı düşünülmektedir. Sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri de büyük olasılıkla enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki

yapısal değişiklikler sonucudur (138). Bu enzimlerin bir diğer özelliği de tazobaktamın CTX-M grubuna karşı inhibitör etkisinin klavulonik asite ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır (121, 128). CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2 en yaygın enzimlerdir. Yayılmaları hem plazmidlere hem de hareketli genetik elementlere bağlıdır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünölmektedir (135,138).

Diğerleri: Ambler sınıf A'da yer alan PER-1enzimi ilk kez 1996 yılında Türkiye'desaptanmış ve PER-1 enzimi taşıyan kökenlerle gelişen infeksiyonlarda prognozun daha kötü olduğu bildirilmiştir. Bu enzim bir genişlemiş spektrumlu beta-laktamazdır. Geniş spektrumlu sefalosporin ve gentamisin direncinden yüksek düzeyde, amikasin direncinden düşük düzeyde sorumlu tutulmaktadır, karbapenemlere etkisiz veya orta derecede etki göstermektedir (117, 128). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan PER–1 enziminin virölansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcöl infeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (139,140,141).

Hasta prognozu ve uygun tedavi seçimi için GSBL'lerin özel testlerle tanımlanması ve klinisyenin de bu enzimler hakkında bilgi sahibi olması gerekmektedir. Rutin testlerden bazı ipuçları elde edilebilir. Laboratuvarda etkilenen antibiyotiklerde azalmış duyarlılık GSBL göstergesi kabul edilir (142,143).

GSBL'lerin her birinin öncelikli olarak tercih ettiği bir substratı bulunmaktadır. Bu nedenle GSBL salgılayan bir izolat seftazidime dirençli iken sefotaksime duyarlı olabilmektedir. Bundan dolayı duyarlılık testlerindeki antibiyotikler kısıtlı tutulursa GSBL varlığı saptanamayabilmektedir. Bu nedenle Amerikan Ulusal Klinik Laboratuar Standartlarını Belirleme Komitesi (The National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS), disk

difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptandığı, inhibisyon zonlarının daraldığı veya MİK değerlerinin yükseldiği durumlarda *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* izolatlarında GSBL üretiminin taranmasını önermektedir (145). GSBL taranmasında yapılan çalışmalarda sefpodoksime ve seftazidimin en yüksek duyarlılığa sahip oldukları, bunların yanında aztreonam, sefotaksim ve seftriaksondan birinin daha varlığının duyarlılığı daha da arttırdığı belirlenmiştir (146). Tarama testleri klavulonik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler; kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E-test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi ve üç boyutlu testtir (128). Ancak Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI)'nın yeni önerileriyle antibiyotikler için MİK sınır değerleri düşürülmüştür ve GSBL tanımlamasının sadece infeksiyon kontrolü amacıyla yapılması önerilmektedir (Tablo 3). Rutin hizmet için GSBL tanımlamasına gerek olmadığı, MİK ne kadar düşükse tedavi olasılığının da o kadar yüksek olduğu belirtilmektedir (145).

Tablo 3. 2010 yılı CLSI GSBL sınır değerleri -M 100- S20-U (Haziran 2010)

Antibiyotik	MİK Değerleri mg/L	Disk difüzyon zon capları (mm)
	Duyarlı-Orta duyarlı- Dirençli	Duyarlı-Orta duyarlı- Dirençli
Sefazolin	≤1 2 ≥4	≤14 - - -
Sefotaksim	≤1 2 ≥4	≥ 26 23-25 ≤ 22
Seftizoksim	≤1 2 ≥4	≥25 22-24 ≤21
Seftriakson	≤1 2 ≥4	≥23 20-22 ≤19
Seftazidim	≤4 8 ≥16	≥21 18-20 ≤17
Aztreonam	≤4 8 ≥16	≥21 18-20 ≤17

* 145 numaralı kaynaktan alıntılanmıştır.

2.4.1.5. Karbapenemler

Karbapenemler kimyasal olarak sentetik ya da yarı sentetik beta-laktam antibiyotiklerdir. *Streptomyces cattle*'ya tarafından üretilen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. Karbapenemlerin kimyasal yapıları ile etkinlikleri arasında sıkı bir ilişki vardır. Penisilinlerden farklı olarak, C1 atomuna bir kükürt atomu buna da bir tiazolidin halkası bağlanmıştır. C2 ve C3 atomlarında doymamış bağlar vardır. 6-transhidroksimetil grubunun varlığı birçok beta- laktamaz türüne karşı dayanıklılığı sağlar. Karbapenemler, başta PBP2 olmak üzere PBP1A, PBP1B, PBP3, PBP4 ve PBP5'e kovalan olarak bağlanarak hücre duvar sentezini engellerler (85).

Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli beta-laktam halkayapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırır. Bunun sonucunda etki spektrumu genişler ve antibakteriyel gücü artar. Karbapenemler tüm antibiyotikler içerisinde en geniş spektrumlu gruptur. Gram negatif basiller ve koklar, gram pozitif koklar ve anaeroplara üzerine etkilidirler. Bu grupta imipenem ve meropenem, ertapenem ve doripenem klinik kullanımda bulunmaktadır (147).

İmipenemin molekül ağırlığı düşüktür, bakteri hücre membranından girişi kolay olur. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise molekülün *P. aeruginosa*'ya etkinliğini sağlamaktadır. Meropenem, gram negatiflere karşı imipenemden daha etkilidir (148).

İmipenem böbrekte enzimatik yıkıma uğraması ve metabolitinin nefrotoksik olmasından dolayı tek başına kullanılamaz. Bir dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1:1 oranında birleştirilerek pazarlanmaktadır. Silastatin sodyum, DHP-1'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür. Silastatinin antibakteriyel etkinliği ya da beta-laktamazlara üzerine etkisi yoktur. İmipenemin etkisini antagonize etmez (148). Diğer beta-

laktam antibiyotiklerde post-antibiyotik etki sadece gram pozitif bakteriler de görülürken, imipenemin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler için post-antibiyotik etkisi saptanmıştır. Bu farkın nedeni, imipenemin PBP2'ye de bağlanarak bakterilerde sferoblast formasyonu oluşturmıştır (147).

Meropenem ise imipenemin aksine insan böbrek dehidropeptidaz I (DHP-1) enzimine karşı çok yüksek stabilite gösteren bir karbapenemdir. Klinik olarak önemli olan hemen tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. PBP2, hem imipenemin hem de meropenemin başlıca hedefidir. Ancak meropenem, *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin PBP2 ve 3'üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve gram negatif bakterilerdeki karbapenemazlar hariç diğer tüm beta-laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır (147).

Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır infeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça değerlidir (147).

Karbapenemler, geniş spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerine karşı dirençli olmaları ve indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantların seçimine meydan vermemeleri nedeniyle diğer antibiyotiklere üstünlük sağlamaktadır. Birçok plazmid kökenli beta-laktamaza dirençlidir. TEM ve SVH tipi beta-laktamazlardan etkilenmezler. Kromozomal beta-laktamazların kuvvetli indükleyicisidirler. Çinko metallo-enzimlere duyarlıdır (149,150).

Karbapenemlere karşı bazı mikroorganizmalar intrinsek direnç gösterebilir. Örneğin; karbapenemlerin MRSA'nın PBP-2a reseptörlerine zayıf bağlanması, bu bakterilerdeki intrinsek dirençten sorumludur (151). Bazı suşlarda, atım pompalarıyla oluşan direnç ya da membran geçirgenliğinde azalmaya, GSBL ya da AmpC enzimlerinin aşırı üretiminin eşlik etmesiyle de karbapenem direnci oluşabilir (152). Özellikle CTX-M tipi

GSBL'lerin gram negatif enterik bakterilerde yayılmasının karbapenem direnci gelişmesini kolaylaştırdığı bildirilmektedir (153). Karbapenemlere yönelik direnç gelişimi, değişen derecede hidroliz kapasitesine sahip karbapenemaz üretimiyle de olmaktadır. Hastane kaynaklı izolatlarda giderek artan GSBL oranlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, karbapenemaz aktivitesi eş zamanlı çoklu ilaç direnç gelişimini de beraberinde taşıyarak mortalitenin de yüksek seyretmesine neden olmaktadır (149).

Enterobacteriaceae ailesi içinde, özellikle karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde sıklıkla izole edilmektedir. Bu izolatların neredeyse tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olup, hastanelerde epidemilere yol açtıkları bildirilmektedir. Karbapeneme dirençli enterik gram negatiflerin neden olduğu bu infeksiyonlar, hastanede yatış süresinin uzamasına, kritik hastalık ve invaziv alet varlığında yüksek morbiditeye neden olmaktadır (154).

Karbapenemler, *Acinetobacter* türlerine en etkili antibiyotikler olarak görünmekle birlikte, bu türlerde de direnç oranları giderek artmaktadır (155).

İlk belirlenen karbapenemazlar etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) tarafından inhibe oldukları için metallo-enzimler olarak adlandırılmıştır. Ancak, 1980'li yılların sonunda karbapenemleri hidrolize eden, EDTA ile inhibe olmayan enzimler saptanmıştır (156).

Karbapenemazların sayısı ve çeşitliliğindeki artışla beraber sınıflandırılma ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu enzimler günümüzde, yapısal özellikleri, çinko afiniteleri ve hidroliz karakterlerinin kombinasyonu temel alınarak üç sınıfta toplanmıştır (111,146). Bu fonksiyonel sınıflamada karbapenemazlar grup 2d, 2f ve 3 içerisinde, moleküler sınıflamada ise sınıf A, B ve D içerisinde yer almaktadır (Tablo 4) (151).

Tablo 4. Substrat ve inhibisyon profiline göre karbapenemazlar

Moleküler sınıf	Fonksiyonel grup	Enzim	Hidroliz profili					İnhibisyon profili	
			Pen	BKS	GSS	Azt	Karba p	EDTA	Klavulanik asit
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	+	+	+	-	+
		KPC	+	+	±	+	+	-	±
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
		NDM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

Pen; Penisilin, **BKS:** Birinci kuşak sefalosporinler, **GSS:** Geniş spektrumlu sefalosporinler, **Azt:** Aztreonam, **Karba p:** Karbapenem, **EDTA:** Etilendiamin tetra asetik asit

*151 numaralı kaynaktan alıntılanmıştır.

Sınıf A karbapenemazlar, tüm beta-laktamları hidrolize eder. Sefoksitin ve seftazidim için zayıf, fakat belirlenebilir bir hidroliz söz konusudur. Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder. GSBL'ler ile karıştırılabilir. Farklı karbapenem hidroliz aktivitesi ve bu aktivitenin klavulanik asit ve tazobaktam tarafından sadece zayıf inhibisyon göstermesidir (71, 97, 100).

Bu grupta yer alan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazları ('*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase', KPC), (KPC 2-11) karbapenemler ve üçüncü kuşak sefalosporinler dahil olmak üzere tüm beta-laktamlara direnç yol açar. Tespit edilmeleri güçtür. Yapılan duyarlılık testlerinde imipenem ve meropenem duyarlı saptanabilirler, ertapenem duyarlılığı daha iyi bir göstergedir. Boronik asit ile inhibe olur. KPC beta-laktamazlar çoğunlukla *K.pneumoniae*'da bulunsa da *E.coli*, *Enterobacter spp.* ve *Salmonella* türlerinde de saptandığı bildirilmektedir (157).

Sınıf B metallo beta-laktamazların hidroliz mekanizması ise, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonu ile beta-laktamların etkileşmesi üzerinedir. Dolayısıyla, bunlar çinko bağlayıcı olan EDTA ve diğer divalent katyonlarla inhibe olur. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilmez (128). Karbapenem hidroliz aktiviteleri diğer grup karbapenemazlara göre daha fazla ve karbapenemler için oluşturdıkları minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri daha yüksektir. Sıklıkla nonfermantatiflerde bulunmakla birlikte, enterik bakterilerde de bildirilmektedir. En sık görülen metallo beta-laktamazlar VIM, IMP, SIM ve GIM enzim aileleridir. Transfer edilebilir imipenem direnci (IMP) ise ilk olarak 1990 yılında bir *P.aeruginosa* izolatında bildirilmiştir. VIM ve IMP dünya çapında en sık belirlenen metallo-beta-laktamaz ailesi üyeleridir (156,158).

NDM-1 (New Delhi Metallobeta-laktamaz) tipi direnç *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında kıtalar arası yayılım göstererek epidemiyeye neden olmuştur. NDM-1 tipi direnç bir plazmid üzerinde yerleşmiştir ve karbapenemlere %90'ın üzerinde direnç gösterebilir. *E.coli* ve *Klebsiella* türleri dışında *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* ve *Enterobacter cloacae* gibi enterobakterilerin diğer üyeleri arasında da bildirilmiştir. KPC ve OXA-48 ile ilişkili direnç biçimlerinin aksine NDM-1 üreten gram negatif enterik bakterilerde karbapenemler için yüksek MİK değerleri bildirilmiştir. NDM-1 en sık *K.pneumoniae* suşlarında saptanırken, diğer suşlar arasında da giderek yayılmaktadır (159).

Sınıf D karbapenemazlar, çoğunlukla *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde, daha az sıklıkla da gram negatif enterik bakterilerde bulunmaktadır. İskoçya'da 1985 yılında plazmid kaynaklı, karbapenemleri hidrolize eden ilk beta laktamaz ARI-1 (*Acinetobacter* rezistan imipenem) olarak tanımlanmıştır. İmipenemi hidrolize etmekte ancak ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere etki etmemektedir (160). Bu enzime daha sonra OXA-23 adı verilmiştir. Yeni çalışmalarla diğer OXA enzimleri (OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-51, OXA-58) tanımlanmıştır (160,161). Tüm bu enzimler plazmidlerce kodlanan sınıf D karbapenemazlardır. OXA-23, 27, 49 (grup 1),

OXA-24, 25, 26, 40, 72 (grup 2), OXA-51 (grup 3), OXA-58 (grup 4) *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci ile ilişkili iken, OXA-48 (grup 5) *E. coli* ve *Klebsiella* türlerinde karbapenem direncine neden olmaktadır (111,162). Bu enzimler oksasilini klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmeleri nedeniyle oksasilinazlar olarak tanımlanmıştır. Klavulanik asit ve EDTA ile zayıf bir inhibisyon gösterir. Özellikle *Enterobacteriaceae*'da OXA-48 aracılığıyla oluşan karbapenem direnci son yıllarda artan oranda bildirilmektedir (162).

Genel olarak oksasilinazlar, seftazidim, sefotaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmez ya da zayıf bir şekilde hidrolize eder (162). OXA tip karbapenemazların çoğu imipenem ve özellikle meropeneme karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterir. OXA tipi karbapenemazlar, serin beta-laktamazlardır. Klavulanik asit ile inhibe olmazlar. İn vitro olarak NaCl ile inhibe olurlar. Karbapenemleri genellikle düşük düzeyde etkilerler, üçüncü kuşak sefalosporinleri etkilemezler. En sık *Acinetobacter spp.*'de görülmekle birlikte *Enterobacteriaceae*'lar arasında da yaygınlaşmaya başlamışlardır (111,162).

Karbapenemaz üreten gram negatif bakterilerin hızlı ve doğru tespiti, uygun antimikrobiyal tedavi seçimi ve infeksiyon kontrol önlemleri için çok önemlidir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde birden fazla risk faktörü taşıyan hastaların hayatı tehdit eden infeksiyonlarının tedavisinde karbapenem kullanımı zorunlu ise MİK değerlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (150,151,164).

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların karbapenem MİK değerleri karbapenemaz enzim tipine, düzeyine, bakterinin türüne, GSBL ve AmpC gibi beta-laktamazların üretimi, azalmış permeabilite ve atım pompası gibi diğer direnç mekanizmalarının varlığına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bazı direnç genlerini taşıyan suşlarda karbapenem MİK değerleri dirençli kabul edilen sınırın altında olabilir. Bu nedenle, karbapenem duyarlılığında

azalmanın belirlenmesi karbapenem direncinin tespitinde klinik olarak önemlidir (65, 162, 163).

CLSI 2010 yılında enterik gram negatif bakteriler için yeni MİK ve disk difüzyon eşiklerini yayınlamıştır (Tablo 5). Bu yeni eşikler MİK için ortalama 1-2 dilüsyon daha düşüktür. Öte yandan yeni disk difüzyon çapları da eski rehberden daha geniş olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu yeni rehber göre eskiden duyarlı olan pek çok suş orta düzey veya tam dirençli tanımlanmaktadır (145,164).

Tablo 5. 2010 Yılı CLSI karbapenem sınır değerleri -M 100- S20-U (Haziran 2010)

Antibiyotik	MİK mg/L	Disk (mm)
	Duyarlı-Orta Duyarlı-Dirençli	Duyarlı-Orta Duyarlı-Dirençli
Ertapenem	≤ 0.25 - ≥ 1	≥ 23 - ≤ 19
İmipenem	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19
Meropenem	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19
Doripenem	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19

*145 numaralı kaynaktan alıntılanmıştır.

Karbapeneme dirençli suşların tespitinde broth mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon, E-test ve otomatize yöntemlerden çok daha yüksek duyarlılık göstermektedir (163,164). İmipenem, meropenem, ertapenem için antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, E-test ve otomatize sistemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada en duyarlı sonuçların %94-97 oranında dilüsyon yöntemleriyle elde edildiği bildirilmiştir. E-test %58-90, otomatize sistemler ise %48-98 oranında duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak, otomatize sistemlerin duyarlılığı yine çalışılan yöntem göre değişiklik göstermiştir (163,165). Testin duyarlılığı ayrıca hangi karbapenem molekülü ile test edildiğine göre değişmektedir. Karbapenemaz aktivitesinin belirlenmesinde değişik

karbapenem moleküllerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada meropenemin daha özgün, ancak ertapenemin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ertapenemin herhangi bir test tarafından duyarlı bulunmaması, imipenem ve meropeneme göre daha duyarlı bir göstergedir (163). Öte yandan ertapenem, imipenem ve meropenemden daha düşük özgüllüğe sahiptir. Çünkü Amp C ve GSBL gibi diğer beta-laktamazların üretimi ve azalmış permeabilite imipenem ve meropenemden daha çok ertapenem MİK değerlerini değiştirir (165, 166, 167). Bu nedenle karbapenemaz aktivitesinin fenotipik olarak belirlenmesinde tarama amacıyla ertapenem kullanılması önerilmektedir (167).

Karbapenem duyarlılığı azalmış izolatlarda Modifiye Hodge testi (MHT) yapılabilir. MHT pozitif ise bakterinin karbapenemaz ürettiği söylenebilir.

Modifiye Hodge Testi (MHT): Karbapenemaz aktivitesini gösteren uygulanması kolay fenotipik yöntemlerden birisi MHT'dir. Bu test CLSI tarafından en az bir geniş spektrumlu sefalosporin alt grubundaki antibiyotiklerden birine direnç (örn. sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksım ve seftriakson) veya karbapenem MİK değerlerinde yükselme ve inhibisyon zon çaplarında azalma olması durumunda önerilmekteydi. Son güncelleme ile karbapenem inhibisyon zon çapları ve MİK değerlerinin belirlenmesi yeterli kabul edilmektedir (151). Ancak rutin olarak dilüsyon yöntemlerinin çalışmadığı laboratuvarlarda KPC, OXA ve MBL gibi enzimlerin hepsini birden tespit edebilmesi ve uygulaması kolay bir test olması nedeniyle kullanışlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (163,165,168).

Test için 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Mueller Hinton buyyonda seyreltildikten sonra Mueller Hinton Agar (MHA) plağına ekilir. Ertapenem, imipenem veya meropenem disklerinden biri plak merkezine yerleştirilir. 10 µL'lik bir öze veya eküvyon ile 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterisi alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20-25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilir ve plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra

değerlendirilir. MHA plağında, test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışına bakılır. Üremede artış varlığında karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilir (145). MHT CLSI kılavuzuna göre %95-100 oranında duyarlıdır. Fakat kişiselleşebilecek bir yöntem olması testi yorumlarken güçlükler neden olabilir. Ayrıca KPC, MBL ve OXA enzimlerinin ayırımını ortaya koyamaması nedeniyle epidemiyolojik olarak kullanışlı bir test değildir ve özgüllüğü düşüktür. GSBL ya da AmpC üreten suşlarla azalmış ya da kaybolmuş porin salınımı yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir (163,164).

Karbapenemazlara özgün inhibitörlerin ilavesiyle karbapenemaz aktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi tanıda yardımcı bir diğer yöntem kombine disk yöntemidir. Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit (3 aminofenil boronik asit), sınıf B metallobeta-laktamazlar için EDTA ya da dipikolinik asidin karbapenemaz aktivite inhibitörü olarak kullanılması birçok çalışmada önerilmiştir (163, 164). Boronik asit fenotipik testinin KPC pozitif suşların belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber ticari, hazır elde edilebilir olmaması ve sonuçların açıklanması için bir güne daha ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır (165).

Karbapenemaz aktivitesini belirlemede bir diğer fenotipik yöntem enzim ekstraksiyonu uygulamasıdır. Bakteriden sonikasyon yöntemiyle elde edilen enzim karbapenem diski üzerine eklenerek enzim içeren kombine diskler oluşturulur.

Karbapenem direncinden şüphe edildiğinde çeşitli fenotipik yöntemler önerilmekle birlikte bu direncin karbapenemaz aracılı olup olmadığı her zaman ayırt edilemeyebilir. Eş zamanlı diğer direnç mekanizmalarıyla karbapenem MİK değerleri yükselebilir. Bu nedenle sadece fenotipik yöntemlerle karbapenemaz aktivitesi belirlenmeye çalışıldığında yalancı pozitif sonuçlar elde edilebilir (163,165).

Genotipik doğrulama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile karbapenem direnç genlerinin belirlenmesinden oluşur. Yeni varyantların artmış sayıları ile genlerin yüksek çeşitliliği nedeniyle, negatif genotipik sonuç alınan suşların da referans laboratuvarlarına gönderilerek ileri genotipik doğrulama yapılması önerilmektedir (164).

2.4.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Aminoglikozidler, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi mantarlardan elde edilen doğal ya da yarı sentetik bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. Genellikle santral yerleşen aminosiklitol halkasına iki veya daha fazla amino şekerin glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşmuştur. Etkilerini ribozomların 30s alt birimine bağlanıp mRNA'daki genetik bilginin yanlış okunmasına yol açıp protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Streptomisin ribozomal 30 S alt birimine bağlanırken, diğer aminoglikozidler 30 S ribozom üzerinde birçok bölgeye ve aynı zamanda ribozomun 50 S alt ünitesine de bağlanırlar (169, 170).

Aminoglikozidler, bakterilerin dış membranlarındaki porin kanallarından periplazmik aralığa difüzyonla girer, ancak bakteri sitoplazmik membranını geçebilmeleri enerji ve oksijene bağımlı aktif transport mekanizması ile olmaktadır. Bu işlem Energy-Dependent Phase 1 (EDP 1) ve Energy-Dependent Phase 2 (EDP 2) olmak üzere iki fazda gerçekleşir. Bu geçiş sırasında hücre duvarındaki polisakkaridleri birbirine bağlayan Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un yerine geçerek hücre duvarında delikler oluşmasına ve hücre duvarının permeabilitesinin bozulmasına da yol açmaktadırlar. Diğer protein sentezini inhibe eden antibiyotikler bakteriyostatik etki gösterirken, aminoglikozidlerin bakterisidal etki göstermesi bu etkiye bağlanmaktadır (169,170). Kalsiyum ve magnezyum gibi divalen katyonlarla, hiperozmolariteyle, düşük pH'da, anaerop ortamda bu işlem inhibe olabilir, durabilir ve dolayısıyla aminoglikozidlerin etkisi azalabilir. Aminoglikozidlerin

konsantrasyona bağı bakterisidal ve post-antibiyotik etkilerinden yararlanılarak tek ve yüksek doz uygulanmalarıyla başarılı tedavi sonuçları elde edilmiş ve beklenenin aksine önemli toksik etkiler de saptanmamıştır (170).

Aminoglikozidler, *Pseudomonas*'lar başta olmak üzere gram negatif aerobasiller üzerine etkilidirler. Gram pozitif bakterilere etkinlikleri kısıtlıdır. Dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarında kombine tedavide etkilidirler (85).

Gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı ribozomal, enzimatik ve membran geçirgenliğinde azalma mekanizmaları ile direnç gelişmektedir.

i) Ribozomal hedeflerde değişiklik: Aminoglikozidler 30s ribozomlarda özgül bağlanma bölgelerine bağlanarak protein sentezinin başlangıcında etki göstermektedir. Ribozomlarda bu alt birim 21 protein ve tek bir 16s RNA molekülünden oluşmaktadır. Bu ribozomal proteinleri kodlayan genlerdeki tek basamaklı mutasyonlara bağlı olarak ribozomal proteinde oluşan tek bir aminoasit değişikliği, o ribozomun antibiyotiğe düşük afinite göstermesine yol açmaktadır. Bu tip direnç sıklıkla streptomisine karşıdır ve genellikle tek bir aminoglikozide özgüdür. Nadir olarak görülür (97,132).

ii) İlacın hücreye girişi veya birikimindeki eksiklik ve atım pompaları: Aminoglikozidlerin hücre membranından transportu oksijene bağımlı, enerji gerektiren bir olaydır. Zorunlu anaerobik bakterilerde oksidatif fosforilasyon olmadığından ilacın hücreye alınması sırasındaki enerji gerektiren evreler kullanılamaz ve yeterli miktarda ilaç hücre içine giremez. Bu mekanizmada antibiyotik grubunun tümüne karşı bir direnç söz konusudur (97,132). Anaerobik bakteriler ve enterokoklar gibi fakültatif anaerobikler aminoglikozidlere doğal dirençlidir. Son yıllarda *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *E.coli* gibi çeşitli gram negatif bakterilerde de aminoglikozidlere doğal direnç yol açan atım pompaları tanımlanmıştır. Atım pompaları genellikle farklı grup antibiyotiklere karşı çoklu dirençten sorumludur.

iii) Enzimatik direnç ve aminoglikozidleri değiştiren enzimler:

Aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en önemli mekanizma, bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir. Değişikliğe uğrayan molekül ribozomlara iyi bağlanamaz ve bakteri aminoglikozid varlığında üremeye devam eder. Aminoglikozid molekülünü değiştiren üç enzim ailesi tanımlanmıştır. Bunlar, aminoglikozid fosfotransferazlar, aminoglikozid asetil transferazlar, aminoglikozid nukleotidil transferazlardır (97). Bir aminoglikozid molekülü birden fazla bölgede değişikliğe uğrayabilir ve bir enzim birçok aminoglikozid molekülünü değiştirebilir. Bu enzimlere ait genler plazmid ve transpozonlarda farklı antibiyotik gruplarına dirençten sorumlu genler ile birlikte bulunduğundan, aminoglikozidler dışındaki antibiyotiklerin kullanımı da aminoglikozid direncini arttırmaktadır. Aerobik bakterilerde, *A.baumannii*'de aminoglikozidlere direnç en fazla plazmid veya kromozomda bulunan genlerce kodlanan değiştirici enzimlerle olmaktadır (171).

2.4.3. Tetrasiklin Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Tetrasiklinler naftasen karboksamid türevi bileşiklerdir. Yapılarında dört halka içerdiklerinden tetrasiklin adını almışlardır. Hepsinde karboksamid ortak yapısı vardır. R, R1, R2 ve R3 pozisyonuna farklı kökenlerin gelmesiyle birbirlerinden ayrılırlar. Terapötik konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkili maddelerdir. Bakteriyostatik etkisi bakteri hücresinde protein sentezi yapmakta olan 70S ribozomun 30S alt ünitesinde yeni tRNA molekülünün yerleşeceği bölgeye reverzibl bir şekilde bağlanarak, protein sentezi inhibisyonu ile meydana gelmektedir. Bu bağlanma sonucu, tRNA-aminoasit kompleksinin ribozom-mRNA kompleksiyle birleşmesi engellenir. Böylece tRNA'nın getirdiği yeni aminoasit sentezlenen polipeptid zincirine bağlanamaz ve protein sentezi inhibe olur. Tetrasiklinler gram negatif bakterilere dış duvardaki porin kanallarından pasif difüzyonla girer (85).

Doksisiklin ve minosiklin yağda çözünürlükleri yüksektir ve bu nedenle dokulara ve vücut sıvılarına iyi penetre olurlar.

Minosiklin vestibüler sistemi bozarak sarhoşluk benzeri bir duygu oluşturabilmektedir. Gebe kadınlarda karaciğer üzerine olumsuz etkisi daha fazla olduğundan kontrendikedir. Doksisiklin nefrotoksitesinin düşük olması ve dokulara kolay dağılması nedeniyle böbrek yetmezliği olanlarda ve prostatitte kullanılmaktadır (169).

Tetrasiklinler gram pozitif ve gram negatif bakterilere, aerop ve anaerop mikroorganizmalara, spiroketlere, özellikle riketsiya, klamidy ve mikoplazma türlerine etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.

Tetrasiklinlere direnç, çoğunlukla plazmid veya transpozonlardaki tet determinantlarının alınması ile ortaya çıkmaktadır. Genellikle, tetrasiklinlerden birine karşı direnç varsa tümüne karşı direnç oluşmaktadır. Tetrasiklin direnç determinantları tet veya otr olarak isimlendirilmektedir.

Bakterilerde tetrasiklinlere dirençte;

- a. Sitoplazmik membrandaki proteinler ile ilacın enerjiye bağlı olarak hücre dışına pompalanması (atım proteinleri)
- b. Ribozomal koruyucu proteinler
- c. Enzimatik olarak ilacın inaktive edilmesi gibi mekanizmalar rol alır.

Tetrasiklin atım proteinleri membranla ilişkili proteinlerdir ve genellikle tetrasikline direnç oluşturup minosikline oluşturmamaktadır (97).

Ribozomal koruyucu proteinler ribozoma bağlanıp yapısını değiştirerek tetrasiklinin ribozoma bağlanmasını engellemektedir. Bu proteinlerden en iyi bilinenleri Tet (M) ve Tet (O)' dur. Hem atım proteinleri hem de ribozomal koruyucu proteinlerin ifadesi tetrasiklin varlığında artmaktadır (97).

Tigesiklin: Yapısal olarak tigesiklin, minosiklinin 9-t-bütilglikamido derivativesidir (177). Bakterilerde tetrasiklin direncinden sorumlu ribozomal korunma ve atım pompalarına karşı dirençli olması tigesiklinin en önemli özelliğidir (173). Tigesiklin de tetrasiklinler gibi bakteri ribozomlarının 30S alt ünitlerine bağlanarak protein sentezini elongasyon basamağında inhibe ederler. Bağlanma noktası tetrasiklinlerden farklı olduğu için Tet (M) proteininden etkilenmez ve tetrasiklinlere göre beş kat daha güçlü olarak bağlanır (172,174,175). Tigesiklin aerobik gram pozitif, gram negatif ve anaerob patojenlere karşı etkinlik gösterir. Ayrıca tigesiklin karbapenemaz üreten *Acinetobacter* suşlarına karşı da etkili bulunmuştur (174).

Yapılan çalışmalarda tetrasiklin direnç genlerini taşıyan birçok bakterinin tigesikline duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ancak, *P.aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp.* ve *Morganella spp* bakterilerinde tigesikline karşı azalmış duyarlılık veya direnç gösterilmiştir (176).

2.4.4. Kloramfenikol ve Direnç Mekanizmaları

Kloramfenikol, 70s ribozomun 50 s alt birimine geri dönüşebilir şekilde bağlanarak protein sentezi sırasında peptidiltransferaz reaksiyonunu inhibe eder. Ribozoma bağlanma, amino açıl-tRNA kompleksinin aminoasit içeren ucunun ribozoma tutunmasını engeller, böylece peptid oluşumu inhibe edilmiş olur (97,150).

En sık gözlenen direnç mekanizması, kloramfenikolü değiştiren kloramfenikol asetil transferaz enziminin sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır. 3-O-asetilasyon ile değiştirilen kloramfenikol ribozomlara bağlanamadığı için bakteride protein sentezi normal olarak devam etmektedir. Bu enzimin sentezi çoğu zaman plazmid bazen de kromozom kontrolündedir. Bir diğer direnç mekanizması, atım pompaları ile hücre içi birikimin engellenmesidir (97,150,177).

2.4.5. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç

Kinolonlar, konsantrasyona bağımlı bakterisidal etkiye sahip antibiyotiklerdir. Bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki tip topoizomera; DNA giraz (topoizomera II) ve topoizomera IV ile etkileşime girerek DNA'nın replikasyonunu ve RNA-polimera enziminin DNA'ya bağlanarak mRNA oluşturmalarını engeller ve nükleik asit sentezini durdururlar. DNA giraz, Gyr A ve Gyr B alt birimlerinden oluşan tetramerik bir enzim olup alt birimler gyrA ve gyrB genlerinden kodlanırlar. Topoizomera IV ise Par C ve Par E alt birimlerinden oluşmaktadır. Kinolonların gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki enzim hedefleri farklıdır. Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz, gram pozitif bakterilerde ise topoizomera IV'tür (178).

Gruptaki ajanların tümü *Enterobacteriaceae* ailesine çok iyi etkinlik gösterir. Ofloksasin ve siprofloksasin, enterik bakterilerin yanı sıra *Acinetobacter spp.* türlerinede etkilidir. Dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarında kombine tedavide siprofloksasin sıklıkla kullanılan bir ajandır (179).

Kinolonlara karşı direnç hedef enzimlerdeki mutasyonlara, geçirgenlikte azalmaya veya antibiyotiğin aktif atılımına bağılı olabilmektedir. Bunların tümü kromozomal mutasyonlar sonucu olmaktadır (150, 180).

i) Hedef enzimde değişiklik: Klinikte gözlenen en sık kinolon direnci topoizomera enzimlerindeki değişikliklere bağılıdır. DNA giraz ve topoizomera IV'ün amino ucundaki 'kinolon direncini belirleyen bölge' adı verilen bir bölgede alt birimlerinde oluşan mutasyonlar sonucu enzimin kinolona bağılandığı bölgede değişim olmakta ve enzim-DNA kompleksinin ilaca afinitesi azalmaktadır (181,182). Bu değişikler spontan nokta mutasyonları ile oluşmaktadır. *A.baumannii*'de kinolon direnci daha çok bu mekanizma ile gelişmektedir (181).

ii) Hücre içindeki antibiyotiğin azalması: Kinolonlar gram negatif bakterilerde hücre içine dış membrandaki porinlerden veya fosfolipidden difüzyon ile girmektedir. Mutasyonlar ile belirli porinlerin kaybı kinolonlara karşı duyarlılığı etkilemektedir. Ancak direnç oluşması için tek başına porin kaybı yeterli değildir. Porinlerdeki azalma ile birlikte enerji gerektiren pompa sistemleri gereklidir (178,180).

Kinolonları enzimatik olarak inaktive eden bir enzim henüz saptanmamıştır. Plazmid kontrolünde direnç ise ilk kez *K.pneumoniae*'nın klinik izolatlarında bildirilmiş ve duyarlı *K.pneumoniae* ve *E.coli*'lere çoğul direnç plazmidi ile geçtiği gösterilmiştir (178,180).

2.4.6. Sülfonamidler, Trimetoprim ve Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde tetrahidrofolat, protein ve nükleik asit sentezi için gereklidir. Birkaç bakteri dışında genellikle bakteriler folik asiti dışarıdan alamadıkları için sentezlerler. Sülfonamidlerin yapısı folik asit sentezi için gerekli olan paraaminobenzoik asit (PABA) yapısına benzer. Bakterilerin büyümesinde gerekli olan ve dışarıdan sağlanan PABA ile sülfonamidler yalancı substrat gibi etkileşerek yarışmaya girmektedir ve PABA yerine geçerek dihidropteroik asit sentetaz enzimini inhibe eder. Böylece tetrahidrofolik asit sentezini inhibe etmektedirler. Trimetoprim ise ardışık olarak iş gören dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek tetrahidrofolik asit sentezini engellemektedir (85).

Bakterilerden farklı olarak insan hücrelerinde, besinlerle alınan folik asit hücre içine geçebildiğinden sülfonamidler etkili olamamaktadır (85).

Sulfonamidlere direnç kromozom veya plazmidlerce kodlanabilmektedir. Kromozomal mutasyonlarla PABA'nın aşırı sentezi ya da *dhps* genlerinde nokta mutasyonları sonucu sülfonamidlere düşük afinite gösteren değişik bir dihidropteroat sentetaz enziminin sentezlenmesi ile

direnç gelişebilirse de gram negatif bakterilerde en sık gözlenen mekanizma plazmid kontrolünde olan dirençtir (183).

Trimetoprim direnç kromozom ya da plazmid kontrolünde gelişebilir. Bakteriler tarafından aşırı dihidrofolat redüktaz enzimi sentezlenmesi, trimetoprim geçirgenliğin kaybı ve sıklıkla plazmid DNA'sı tarafından taşınan düşük afiniteli *dhfr* genleri tarafından trimetoprim dirençli yeni bir dihidrofolat redüktaz enzimi sentezlenmesi ile direnç ortaya çıkabilmektedir (183, 184).

A.baumannii izolatları trimetoprim-sülfametoksazole karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedirler, ancak bu direncin genetik temeli çok az bilinmektedir. (183).

2.4.7. Polimiksin Grubu Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Polimiksinler kimyasal olarak beş farklı bileşiği içeren (polimiksin A-E) polipeptid antibiyotiklerdir. Klinik pratikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmıştır (185).

Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir peptid olan kolistin ile gram negatif bakterilerin dış membranındaki anyonik lipopolisakkarit molekülleri elektrostatik ilişkiye girerler ve hücre membranında düzensizliğe yol açarlar. Kolistin, lipopolisakkarit moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve oluşan permeabilite bozukluğu ile bakterinin ölümüne neden olur. Kolistin konsantrasyona bağımlı olarak etki göstermektedir. Gram negatif bakterilerde mutasyon ya da adaptasyon yolu ile kolistine karşı direnç gelişebilmektedir (186,188). Son yıllarda çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* bakterilerinin neden olduğu infeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli suşların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kolistin kullanılmaktadır (187).

2.5. *Acinetobacter* ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerde Tedavi

Antibiyotiğe duyarlı *Acinetobacter* izolatlarının neden olduğu infeksiyonlar, genelde geniş spektrumlu sefalosporinler, beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar veya tek başına ya da aminoglikozidle kombinasyon halinde kullanılan karbapenemlerle tedavi edilmektedir (189).

Çoğul ilaca dirençli izolatların neden olduğu infeksiyonlar için antibiyotikseçenekleri oldukça sınırlı olabilmekle birlikte, karbapenemler, sulbaktam ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak görülmektedir (189, 190).

En etkin in vitro ajanlar olarak ise polimiksinler, yani polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) görülmektedir. Çoğul ilaca dirençli gram negatif basillerin artması polimiksin kullanımını geri getirmiştir (185,186,187). Ancak bazı in vitro çalışmalarda, fenotipik olarak duyarlı bazı *Acinetobacter* suşlarında kolistin heterodirenci olduğu saptanmıştır (191,192).

Yapılan çalışmalarda tigesiklinin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan gram negatif bakterilere ve çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter* cinsi bakterilere in vitro etkinliğinin oldukça iyi olduğu gösterilmiştir (193).

Bazı yayınlarda da sadece tetrasiklinlere duyarlı *A.baumannii*'nin neden olduğu ventilatör ilişkili pnömonide intravenöz yoldan doksisisiklin veya minosiklin tedavisinin etkili olduğu bildirilmiştir (194).

Çoklu ilaç direnci göstermeyen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının neden olduğu infeksiyonların tedavisi birinci kuşak sefalosporinler, beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar, aminoglikozid grubu, kinolon grubu antibiyotiklerle yapılabilirken başta genişlemiş spektrumlu beta laktamaz salınımı olmakla birlikte değişik mekanizmalarla ortaya çıkan çoklu ilaca dirençli suşların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotikler kısıtlıdır. Bu suşların neden olduğu infeksiyonun ciddiyeti ve yeri tedavide kullanılacak antibiyotiği belirlemede göz önünde bulundurulması gereken diğer faktörlerdir (195).

Beta-laktamazların beta-laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere etkisinin olmamasından dolayı, kinolonlar ve aminoglikozidler gibi antibiyotikler GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Bununla birlikte GSBL direnci ile kinolon ve aminoglikozid direncinin birlikte görülme sıklığının artması bu antibiyotiklerin kullanımını kısıtlamaktadır (196).

GSBL'ler genellikle klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olurlar. Bunların içinde GSBL'ye en etkilisi tazobaktamdır. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak mikroorganizmalarda yüksek oranda beta-laktamaz yapımı, özellikle inhibitör dirençli beta-laktamaz (IRT)'ların varlığı veya porin defekti olması gibi durumlarda etkisiz kalabilirler. AmpC indüklenebilir beta-laktamazlara beta-laktamaz inhibitörleri etkilidir. Ayrıca klavulonik asit beta-laktamaz indüksiyonuna neden olabilir (82,94,95,197,198).

Karbapenemler GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde ilk seçenek antibiyotiklerdir. Tedavide tek başın kullanılabilirler. GSBL pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde kombine tedavinin karbapenem tedavisine üstünlüğü yoktur (147,157,166,196).

GSBL ve karbapenemaz üreten mikroorganizmaların tedavisi infeksiyonun yeri, şiddeti, protez veya implant varlığı, hastanın metabolik durumu ve hasta ile ilgili diğer faktörlere göre belirlenir.

2.6. *Acinetobacter* ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerde Tedavide Kombine Antibiyotik Kullanımı

Geniş spektrum elde etmek, polimikrobiyal infeksiyonların tedavisinde, dirençli mikroorganizma oluşumunu azaltmak ve monoterapilere oranla daha

güçlü bir bakterisidal veya bakteriyostatik etki elde etmek amacı ile antibiyotikler kombine kullanılabilmektedirler. Antibiyotiklerin kombine kullanımlarında in vitro olarak; aditif, sinerjik veya antagonistik etkileşme görülebilmektedir. Sinerjistik etkileşmede başlıca üç mekanizma rol oynamaktadır.

- i) Ortak metabolik yolun inhibisyonu; Örneğin trimetoprim-sülfametoksazol.
- ii) Metabolize eden enzimin indüksiyonu ile ilaç yıkımının azaltılması; Beta-laktam, beta-laktamaz inhibitörlerinin birlikte kullanılması bu mekanizmaya en güzel örnektir.
- iii) Farklı etki mekanizmaları; Bakteri çeperinin ilaca geçirgenliğinin artırılması. Bu mekanizmaya örnek olarak beta-laktam antibiyotiklerle aminoglikozidlerin kombine kullanımı gösterilebilir (199,200).

Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının *A. baumannii*'ye karşı in-vitro etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda değişik sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin karbapeneme duyarlı suşlarda, sulbaktam ile rifampisin ya da azitromisin kombinasyonu, beta-laktamlarla kinolon kombinasyonu, karbapenem ve aminoglikozid kombinasyonları sinerjik etkili bulunmuştur (201,202). Karbapeneme dirençli suşlarla sinerjistik etkili bulunan kombinasyonlar ise sulbaktam-ampisilin ile rifampisin kombinasyonu, karbapenemlerle sulbaktam-ampisilin kombinasyonu, kolistin ile rifampisin ve kolistin ile karbapenem kombinasyonları olmuştur (201,205,206). Karbapeneme duyarlı suşlar ile yapılan başka bir çalışmada ise imipenem amikasin kombinasyonunun tek başına imipenem tedavisinden daha az etkin olduğu belirlenmiştir (203). Tigesiklin çalışmalarında ise tigesiklinin amikasin, meropenem, imipenem, kinolon, sulbaktam ve rifampisin ile kombinasyonlarının etkinliğinin tek başına tigesiklin kullanımından farksız olduğu saptanmıştır (204).

GSBL ve/veya karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşları için de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada tigesiklinin KPC üreten suşlarda tek başına ya da kolistin ve meropenem ile kombinasyonunun in-vitro etkinliği değerlendirilmiş, tigesiklin kolistin kombinasyonunun yüksek oranda sinerjistik etkili olduğu saptanmıştır (207). Bazı yayınlarda da fosfomisin hem GSBL hem de KPC üreten *K.pneumoniae* suşlarında kolistin ve gentamisin ile kombinasyonunun etkili olduğuna dair bilgiler sunulmaktadır (208, 209, 210).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilmiş olan, klinik örneklerden izole edilen çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* ile gram negatif enterik bakterilerde çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.1. Örneklerin Toplanması

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesinde mikrobiyoloji laboratuvarlarına çeşitli kliniklerde (kalp damar cerrahisi, genel cerrahi, üroloji, anestezi ve reanimasyon ünitesi vb.) yatmakta olan hastalardan gönderilen değişik klinik örneklerden (balgam, idrar, trakeal aspirat, kan vb.) Nisan 2010 ile Aralık 2011 tarihleri arasında izole edilen yirmi tane kolistine duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli olan *A. baumannii*, yirmi tane hem kolistine dirençli hem de çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii* suşu ile yirmi tane de Ocak 2012-Nisan 2012 tarihleri arasında izole edilen hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten hem de karbapenemaz pozitif olan *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya alındı. Aynı hastadan gönderilen örneklerden izole edilen suşlardan sadece bir tanesi çalışmada kullanıldı.

İzole edilen yirmi tane kolistine duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli ve yirmi tane hem kolistine dirençli hem de çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii* suşu ile yirmi tane de hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten hem de karbapenemaz pozitif olan *Klebsiella pneumoniae* suşunda kolistinin trimetoprim-sulfametoksazol, rifampisin, doksisisiklin, sulbaktam, imipenem,

tigesiklin ve kloramfenikol ile kombinasyonlarının in-vitro olarak sinerjistik etkili olup olmadıkları E-test yöntemi ile değerlendirildi.

3.2. İdentifikasyon ve Duyarlılık Testleri

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarlarında, klasik tanımlama sistemleri ile birlikte Phoenix™otomatize tanımlayıcı sistemiyle tür düzeyinde tanımlanmış olan kolistinin dahil olmadığı en az üç antibiyotik grubuna direnç gösteren yirmi tane *A.baumannii* izolatu ile kolistinin de dahil olduğu en az üç antibiyotik grubuna direnç gösteren yirmi tane daha *A.baumannii* izolatu, ile Phoenix™yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ürettiği saptanan beraberinde Phoenix™otomatize sistemiyle tür düzeyinde tanımlanan ve karbapenemlere dirençli olduğu belirlenen, modifiye hodge testiyle de karbapenemaz pozitif olduğu tespit edilen yirmi adet de *K.pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı. İzolatlar, çalışma gününe kadar brain heart infüzyon buyyon içeren eppendorflara pasajlanarak, derin dondurucuda (-80 °C'de) saklandı. Derin dondurucudan çıkarılan *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* izolatları çalışmadan önce dökülmüş EMB ve koyun kanlı agar besiyerlerine pasajlandı. Aerobik ortamda, normal atmosferde, 37°C de 18-20 saat inkübasyon sonrası taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri çalışmada kullanıldı. Kontrol suşları olarak *Pseudomonasaeruginosa* ATCC (AmericanTypeCulture Collection) 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

A.baumannii ve *K.pneumoniae* izolatlarına karşı kolistin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampisin, sulbaktam, imipenem, tigesiklin ve kloramfenikolün Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri E-test yöntemi (Liofilchem MIC Test Strip®, Italy) ile belirlendi. E-test için üretici firmanın önerileri doğrultusunda; elde edilen saf bakteri kolonilerin Mueller Hinton buyyonunda 0,5 McFarland Standard bulanıklığına eş süspansiyonlar elde edildi. Hazırlanan eş süspansiyonlar steril pamuklu eküvyon çubuğu

yardımı ile önceden hazırlanmış ve kurutulmuş olan Mueller Hinton agar içeren besiyeri plakların yüzeyine ekim yapıldı. E-test şeritleri yerleştirilmeden önce 15-20 dakika beklendi. Pens yardımı ile antibiyotiklerin E-test şeritleri, besiyeri plaklarına yerleştirildi. Aerobik ortamda, normal atmosferde, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 16-20 saat inkübasyon sonucunda elips şeklindeki inhibisyonzonunun şeritle kesiştiği nokta sayısal MİK değeri olarak kabul edildi. Her bir antibiyotiğin MİK değerleri üretici firma ve CLSI önerilerine uygun olarak ölçülerek sonuçlar CLSI'nın sınır değerleri baz alınarak değerlendirildi.

E-test ile fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksini belirlemek için önce kombinasyonda yer alan A ve B antibiyotiklerinin MİK değerleri kaydedildi. Kombinasyon MİK değerini saptamak için besiyerine önce B şeridi konmuş ve 37°C 'de bir saat inkübe edildikten sonra, konsantrasyon çizgileri tam çakışacak şekilde B'nin yerine A şeridi yerleştirilmiştir. Besiyerleri $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 16-20 saat inkübe edildikten sonra, inhibisyonzon çapının E-test şerit kenarının kestiği noktada B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri kaydedildi. Aynı işlem önce A ve sonra B antibiyotiği olacak şekilde tekrarlandı. Kombinasyonun etkinliğini belirlemek için FİK indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

B'nin varlığında A'nın MİK'i

FİK A= -----

Tek başına A'nın MİK'i

A'nın varlığında B'nin MİK'i

FİK B=-----

Tek başına B'nin MİK'i

FİK indeksi = FİK A + FİK B

FİK indeksi değeri 0.5 ve altında (≤ 0.5) ise kombinasyon sinerjistik etkili, 0.5 ile bir arasında ise (0.5–1) aditif etkili, birden büyük ikiden küçük ise ($>1-<2$) indifera (etkisiz), iki ve üstünde (≥ 2) ise antagonist etkili olarak değeriendirildi.

Çalışmaya alınan çoklu ilaca dirençli 40 tane *A.baumannii* ve 20 tane *K.pneumoniae* izolatında değeriendirilen yedi tane antibiyotik kombinasyonu için toplamda 420 FİK değeri hesaplandı. Sadece sinerjistik etkiler değil aditif, indifera ve antagonistik etkileşimler de kaydedildi.

Kolistin-trimetoprim/sulfametoksazol, kolistin-rifampisin, kolistin-doksisiklin, kolistin-sulbaktam, kolistin-imipenem, kolistin-tigesiklin, kolistin-kloramfenikol kombinasyonlarının in vitro etkileşimlerinde elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 15 programında Fisher'in ki-kare testi, Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Klinik İzolatların Özellikleri

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesinde yatmakta olan hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen değişik klinik örneklerden Nisan 2010 ile Aralık 2011 tarihleri arasında izole edilen yirmi tane kolistine duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii*, yirmi tane hem kolistine dirençli hem de çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii* suşu ile yirmi tane de Ocak 2012-Nisan 2012 tarihleri arasında izole edilen hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten hem de karbapenemaz pozitif çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşu değerlendirilmiştir. Değerlendirilen *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* suşlarının kliniklere ve izole edildikleri örneklerle göre dağılımı tablo 6, tablo 7, tablo 8 ve tablo 9’da sunuldu.

A.baumannii suşlarının %55’i anestezi ve reanimasyon kliniğinden gönderilen örneklerden izole edildi. Bu izolatların %57.5’i trakeal aspirat örneklerinden üretildi. *K.pneumoniae* suşları ise en sık üroloji kliniğinden (%45) ve idrar örneklerinden (%65) izole edildi.

Tablo 6. *A. baumannii* suşlarının kliniklere göre dağılımı

<i>A.baumannii</i> (n=40)	Anestezi ve Reanimasyon	Kardiyovasküler cerrahi	Genel cerrahi	Beyin cerrahisi
Sayı	22	10	4	4
Yüzde (%)	55	25	10	10

Tablo 7. *A.baumannii* suşlarının örneklerle göre dağılımı (n=40)

	Trakeal aspirat	Kan	Abse	Beyin-omurilik sıvısı
Sayı	23	8	4	5
Yüzde (%)	57.5	20	10	12.5

Tablo 8. *K.pneumoniae* suşlarının kliniklere göre dağılımı (n=20)

	Reanimasyon	Üroloji	Endokrin	Nöroloji	İnfeksiyon Hastalıkları
Sayı	6	9	2	2	1
Yüzde (%)	30	45	10	10	5

Tablo 9. *K. pneumoniae* suşlarının örneklerle göre dağılımı (n=20)

	Trakeal aspirat	İdrar	Abse
Sayı	6	12	2
Yüzde (%)	30	60	10

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan kolistin duyarlı *A.baumannii* izolatlarının %100'ü trimetoprim-sulfametoksazole, %50'si rifampisine, %80'i doksisisikline, %65'i sulbaktama dirençli iken imipenem ve kloramfenikole %100 dirençli bulunmuşlardır. İzolatların tümünün tigesikline duyarlı olduğu görülmüştür (Tablo 10). Kolistin dirençli olan *A.baumannii* izolatlarının ise trimetoprim-

sulfametoksazole %5, rifampisine %70, doksisisikline %75, sulbaktama %35, İmipeneme %80 ve kloramfenikole %100 dirençli olduğu belirlenmiştir. Yine bu izolatların da tümü tigesikline duyarlı bulunmuşlardır (Tablo 11).

Tablo 10. Kolistine duyarlı olan *A.baumannii* izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20)

	CT	SXT	RIF	DX	SB	IMP	TIG	CL
Duyarlı (%)	100	0	25	0	0	0	100	0
Orta duyarlı %	0	0	25	20	35	0	0	0
Dirençli (%)	0	100	50	80	65	100	0	100
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.								

Tablo 11. Kolistine dirençli olan *A.baumannii* izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20)

	CT	SXT	RIF	DX	SB	IMP	TIG	CL
Duyarlı (%)	0	95	30	0	30	0	100	0
Orta duyarlı (%)	0	0	0	25	35	20	0	0
Dirençli (%)	100	5	70	75	35	80	0	100
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.								

K.pneumoniae suşlarının %15'i kolistine, %85'i trimetoprim-sulfametoksazole, %65'i rifampisine, %80'i doksisikline, %100'ü sulbaktama %100'ü imipeneme (meropenem ve ertapeneme direnç oranı da %100), %75'i kloramfenikole dirençli olarak saptanmıştır. Yine bu suşların tümü tigesikline duyarlı bulunmuşlardır (Tablo 12).

Tablo 12. *K.pneumoniae* izolatlarının E-test yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları (n=20)

	CT	SXT	RIF	DX	SB	IMP	TIG	CL
Duyarlı (%)	85	15	0	20	0	0	100	25
Orta duyarlı (%)	0	0	35	0	0	0	0	0
Dirençli (%)	15	85	65	80	100	100	0	75
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.								

Çalışmaya alınan 60 çoklu ilaca dirençli bakteri için 420 FİK değeri hesaplanmış ve %28,8 (121/420) sinerjistik, %56,2 (236/420) aditif, %15 (63/420) indiferan etki saptanmıştır. Kolistine duyarlı *A.baumannii* suşlarında %35 (50/140) sinerjistik, %50 (70/140) aditif, %14,3 (20/140) indiferan etkileşim olduğu, kolistine dirençli suşlarda ise sinerjistik etki %21,4 (30/140), aditif etki %64,3 (90/140) ve indiferan etki %14,3 (20/140) oranında görülmüştür. *K.pneumoniae* suşlarında sinerjistik etkinin %29,3 (41/140), aditif etkinin %54,3 (76/140), indiferan etkinin ise %16,4 (23/140) olduğu belirlenmiştir. Aditif etki tüm bakteri gruplarında en çok elde edilen sonuç olmuştur. Kolistin duyarlı *A.baumannii* izolatlarındaki kolistin-tigesiklin ve kolistin-kloramfenikol kombinasyonları ile kolistin dirençli *A.baumannii*

izolatlarındaki kolistin-kloramfenikol ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatlarındaki kolistin-sulbaktam ve kolistin-tigesiklin kombinasyonları dışındaki antibiyotik kombinasyonlarında yine en çok karşılaşılan etki aditif etki olmuştur. Hiçbir antibiyotik kombinasyonu ile antagonistik etki ortaya çıkmamıştır (Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15).

Sinerjistik etki tüm çoklu ilaca dirençli bakteri gruplarında en çok kolistin-tigesiklin kombinasyonunda görülmüş, kolistin duyarlı *A.baumannii* grubunda %80, kolistin dirençli *A.baumannii* grubunda %45, *K.pneumoniae* grubunda ise %80 oranında sinerjistik etki saptanmıştır (Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15).

Tablo 13. Kolistin duyarlı olan çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20)

	FİK					
	Sinerjistik		Aditif		Etkisiz	
	n	%	n	%	n	%
CT-SXT	7	35	13	65	0	0
CT-RIF	9	45	11	55	0	0
CT-DX	9	45	11	55	0	0
CT-SB	3	15	17	85	0	0
CT-IMP	6	30	14	70	0	0
CT-TIG	16	80	4	20	0	0
CT-CL	0	0	0	0	20	100
Total	50	35	70	50	20	14,3
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.						

Tablo 14. Kolistin dirençli olan çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20)

	FİK					
	Sinerjistik		Aditif		Etkisiz	
	n	%	n	%	n	%
CT-SXT	4	20	16	80	0	0
CT-RIF	6	30	14	70	0	0
CT-DX	5	25	15	75	0	0
CT-SB	2	10	18	90	0	0
CT-IMP	4	20	16	80	0	0
CT-TIG	9	45	11	55	0	0
CT-CL	0	0	0	0	20	100
Total	30	21,4	90	64,3	20	14,3
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.						

Tablo 15. Çoklu ilaca dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının oluşturduğu etkiler (n=20)

	FİK					
	Sinerjistik		Aditif		Etkisiz	
	n	%	n	%	n	%
CT-SXT	3	15	17	85	0	0
CT-RIF	7	35	13	65	0	0
CT-DX	6	30	14	70	0	0
CT-SB	0	0	0	0	20	100
CT-IMP	4	20	16	80	0	0
CT-TIG	16	80	4	20	0	0
CT-CL	5	25	12	60	3	15
Total	41	29,3	76	54,3	23	16,4
CT: Kolistin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, RIF: Rifampisin, DX: Doksisiklin, SB: Sulbaktam, IMP: İmipenem, TIG: Tigesiklin, CL: Kloramfenikol.						

Kolistin duyarlı ve dirençli olan *A.baumannii* izolatları tüm antibiyotik kombinasyonlarının etkileri açısından karşılaştırıldığında; duyarlı olanların %35,7'sinin sinerjistik ve %50'sinin aditif etkili olduğu, dirençli olanların ise %21,4'ünün sinerjistik ve %64,3'ünün de aditif etkili olduğu görülmüş ve kolistin duyarlı izolatlarda sinerjistik etkinin, kolistine dirençli izolatlarda ise aditif etkinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aradaki bu farklar da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 16).

Tablo 16. Çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii* izolatlarında kolistine duyarlı ya da dirençli olma ile antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin karşılaştırılması

	FİK							
	Sinerjistik		Aditif		İndiferan		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Duyarlı	50	35,7	70	50,0	20	14,3	140	100
Dirençli	30	21,4	90	64,3	20	14,3	140	100
Total	80	28,6	160	57,1	40	14,3	280	100
Ki-Kare=7,56; sd=2; p=0,023								

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten ve karbapenemaz pozitif olan çoklu ilaca dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında da herhangi bir antibiyotiğe duyarlı ya da dirençli olmakla antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik ya da aditif etkili olması arasında istatistiksel olarak bir ilişki olup olmadığına bakıldığında ise herhangi bir antibiyotiğe duyarlı olanların %83,3'ünde antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği, herhangi bir antibiyotiğe dirençli olanlarda ise %8 oranında sinerjistik etki görüldüğü

belirlenmiştir. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 17).

Tablo 17. Çoklu ilaca dirençli olan *K.pneumoniae* izolatlarında antibiyotik duyarlılıkları ile antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin karşılaştırılması (n=20)

		FİK					
		Sinerjistik		Aditif		Total	
		n	%	n	%	n	%
MİK	Duyarlı	35	83,3	7	16,7	42	100
	Dirençli	6	8,0	69	92,0	75	100
	Total	41	29,3	76	54,3	140	100
Ki-Kare=63,8; sd=1; p=0.0001							

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toplumdan ve özellikle hastaneden izole edilen gram negatif bakterilerde özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artması ile antibakteriyel ilaçlara karşı artan direnç, tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından bir tanesi haline gelmiştir (1,2).

Son yıllarda antibakteriyel ilaç direncinde artış görülen gram negatif bakteriler içinde *Acinetobacter* cinsi bakterilerle, *Enterobacteriaceae* ailesi önemli bir yer tutmaktadır (9,10). Her iki bakteri grubu da sıklıkla hastane infeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (9,11).

Acinetobacter cinsi içinde *Acinetobacter baumannii* antibiyotiklere en çok dirençli olan ve hastane infeksiyonlarından en sık izole edilen tür olarak görülmektedir (15). Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve/veya karbapenemaz gibi çeşitli enzimler üreterek çoklu ilaca dirençli hale gelen *K.pneumoniae* suşları da *Enterobacteriaceae* ailesi içinde hastane infeksiyonlarında ve antibakteriyel direnç gelişiminde öne çıkmaktadır (16). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi *Enterobacteriaceae* infeksiyonlarında özel bir sorun oluştursa da esas olarak karbapenem direncine yol açan mekanizmalar gibi diğer mekanizmalar çoklu ilaç direncinde daha ön plana çıkmaktadır (211).

ABD ve Kanada'dan veriler gram negatif bakteriler arasında çoklu ilaç direncinin oldukça yüksek oranlarda olduğunu göstermekte, coğrafik bölgelere göre değişmekle birlikte *A.baumannii* için %30-60, *K.pneumoniae* için %10-15 arasında çoklu ilaç direnci oranları bildirilmektedir (212, 213). ABD ve Avrupa'dan yapılan bildirimlerden de özellikle metallo-beta-laktamaz ve KPC aracılı karbapenem direncinin oldukça büyük sorun oluşturduğu anlaşılmaktadır (214,215).

Ülkemizde de çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler önemli bir problem oluşturmakta ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastalar arası yayılım vesalınlar yapabilme özelliği taşımaktadır (64, 216).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *A.baumannii* için direnç oranları imipenem için %0-63, siprofloksasin için %32-87, amikasin için %41-70, gentamisin için %62-87, trimetoprim-sulfametoksazol için %63-75, seftriakson için %77-85 olarak bildirilmiştir (217). Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastalardan izole edilen *A.baumannii* suşlarında imipenem direnci %25 oranında bulunmuş olup, direnç oranının yıllar içerisinde arttığı gözlenmiştir (218).

2005-2008 yılları arasındaki verileri değerlendiren EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)'ın 2008 yılı yıllık raporunda Türkiye'de *K.pneumoniae* suşlarında üçüncü kuşak sefalosporin direnci %45, kinolon direnci %26, aminoglikozid direnci %22, karbapenem direnci ise %3 olarak bildirilmiştir (211).

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin kliniğe yansması hastanede kalış süresinin uzaması, nozokomiyal salgınlar, tedavi başarısızlığı ve mortalitede artış şeklinde olmaktadır (151, 190, 203, 219).

Çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler geliştirdikleri direnç mekanizmaları ile bir tek antibiyotik grubuna değil, genel olarak tüm antimikrobiyallere karşı direnç kazanırlar. Bu tür mikroorganizmalarda saptanan değişik direnç mekanizmaları, tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerini çok azaltmıştır. Özellikle hastane kökenli suşların birden fazla direnç mekanizmalarına sahip olmaları tedavi seçeneklerini büyük oranda kısıtlamaktadır. Dolayısıyla bu bakterilerle gelişen infeksiyonlarının tedavisi ciddi anlamda güçleşmektedir. Bu infeksiyonların antimikrobiyal tedavisi ile ilgili çalışmalar ise sınırlı sayıda hasta vakalarına dayanmaktadır, bu nedenle uygun tedavi belirlenememiştir. Bu durum da farklı tedavi seçeneklerinin araştırılmasını gerektirmiştir (220).

Çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilerin yükselen tehdidine rağmen bu bakterilerle oluşacak infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek yakın tarihte hiç bir yeni sınıf ilaç piyasaya çıkmamıştır (221). Mevcut koşullarda klinisyenlerin yaşadığı sıkıntılar ise hem kolistin gibi eski antibiyotiklerin yeniden kullanımını hem de antibiyotiklerin kombine kullanımını gündeme getirmiştir (186, 199).

Kombinasyon tedavisi esas olarak antibiyotiklere direnç gelişimini önlemek için kullanılmakla beraber özellikle multibakteriyel infeksiyonların tedavisinde, dirençli izolatlar karşı sinerjistik etki sağlanmasında, yüksek mortaliteyle seyredebilecek ciddi infeksiyonların tedavisinde ve ilaçların doza bağlı yan etkilerinin azaltılmasında olumlu sonuçlar doğurabilmektedir (8). Ciddi infeksiyonlarda monoterapiyi destekleyen randomize çalışmalar yoktur ve ciddi morbidite ve mortalite nedeniyle kombinasyon tedavisi önerilmektedir.

Farklı mekanizmalarla etki gösteren antimikrobiyal ajanların kombinasyonu daha iyi bir farmakodinamik etki ya da sinerji ortaya çıkarabileceği gibi antagonizmaya da neden olabilir. Antibiyotikler arasında antagonistik etkileşimlerin olmaması klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların tedavilerinde kullanılabilecek antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro olarak ortaya çıkaracakları etkilerin özellikle de sinerjistik etkilerin belirlenmesinin yol gösterici olabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır (222, 223).

Tüm bu saydığımız nedenlerden dolayı biz de çalışmamızda çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek yeni seçenekler ortaya koymak ve hali hazırda kullanılmakta olana değişik antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini E-test metodunu kullanarak araştırmayı amaçladık. Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Cebeci Hastanesi'nde çeşitli kliniklerde yatmakta olan hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen değişik klinik örneklerden izole edilen yirmi tane

kolistin duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli olan *A. baumannii*, yirmi tane hem kolistin dirençli hem de çoklu ilaca dirençli olan *A.baumannii* suşu ile yirmi tane de hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten hem de karbapenemaz pozitif olan *Klebsiella pneumoniae* suşunda kolistin ile çeşitli antibiyotiklerin kombinasyonlarının in-vitro olarak sinerjistik etkili olup olmadıklarını E-test yöntemi ile değerlendirdik.

E- test metodu diğer sinerji testlerine göre daha az emek harcanan ancak dama tahtası metodu ile yüksek korelasyon gösteren bir metottur. Mano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 131 *Burkholderia cepacia* izolatında değişik antimikrobiyallerin kombinasyonu bu iki metot ile karşılaştırılmış, E- test ve dama tahtası yöntemleri arasında %90 oranında korelasyon olduğu belirlenmiştir (224). Bonapa ve arkadaşları tarafından ise E-test metodu uygulanırken üreticinin önerilerine uyuşmayan şekilde düzensiz bir metodolojinin kullanılmasının aradaki farkı artırabileceği gösterilmiştir (225).

Kolistin önemli yan etkileri ve daha az toksik antibiyotiklerin keşfi nedeniyle 1970'li yıllardan sonra kullanım dışı kalmıştır. Ancak çoklu ilaca dirençli gram negatif suşların ortaya çıkması ve bu suşların kolistin duyarlı olduklarının bildirilmesiyle kullanımı yeniden gündeme gelmiştir. Son yıllarda polimiksinlerin farmakodinamiği ve farmakokinetiği ile ilgili elde edilen bilgiler, ve klinik deneyimler polimiksinlerin önceden sanıldığı kadar toksik olmadığını göstermektedir (226). Bu ilaçlara bağlı nörotoksisite bildirilmemiştir ve nefrotoksik etkileri nadir olup genellikle geri dönüşümlüdür (227).

Ancak çoklu antibiyotik direnci taşıyan bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde oldukça etkili olduğu düşünülen kolistinin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasıyla birlikte *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* suşlarında direnç geliştiği bildirilmiştir (228). En yüksek direnç oranları Asya'dan ve takibinde Avrupa'dan bildirilmektedir. Ancak kolistin heterorezistan *A.baumannii* suşlarının kolistin dirençli suşlardan daha çok sayıda olduğu gözlenmektedir (192). Bu direnç gelişiminde ise dirençli

bakterilerle gelişen infeksiyonların tedavisinde kolistinin tek başına kullanılması oldukça önem taşır. Direnç gelişiminin önüne geçilmesi amacıyla kolistinin bu tür infeksiyonlarda tek başına kullanımından kaçınılması, kombinasyon tedavisinin tercih edilmesi önerilmektedir (228).

Kolistinin KPC üreten *K.pneumoniae* ile infekte 18 hastalık bir grupta tek başına ve kombinasyon şeklinde kullanımının karşılaştırıldığı bir çalışmada, tek başına kullanıldığında tedavi başarısı %14 olarak bulunurken, kombinasyon tedavisi ile %73 başarı elde edilmiştir (229).

Başka bir çalışmada yine KPC üreten *K.pneumoniae* ile persistan infeksiyonu olan 16 hastanın 12'sinde kolistin monoterapisi, 4'ünde de tigesiklin ile kombinasyon tedavisi uygulanmış, kolistin monoterapisi uygulanan 12 hastanın üçünde tedavi sırasında kolistin direnci geliştiği saptanırken kombinasyon tedavisi uygulanan dört hastada hiç direnç gelişimi olmamıştır (230).

Kolistinin imipenem, meropenem, ampisilin-sulbaktam, siprofloksasin, amikasin veya gentamisinle ikili kombinasyonlarının monoterapiden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (202, 231).

Kolistin bakterilerin dış membran permeabilitesini artırarak karbapenemlerin aktivitesine katkıda bulunmaktadır. Montero ve arkadaşları yüksek seviyede imipenem direncinde imipenem, kolistin, rifampisin veya tobramisin kombinasyonunun etkili olabileceğini belirtmektedir (232).

Çalışmamızda suşların çoğu imipenem dirençli olmakla beraber (sadece dört suş orta duyarlı) kolistin duyarlı ve çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* grubunda %30, kolistin ve çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* grubunda %20, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* grubunda ise %20 oranında sinerjistik etki ortaya çıktığı ancak aditif etkinin en fazla olduğu görülmüştür. İndiferan ve antagonistik etki ile karşılaşılmamıştır.

Rifampisinin çoklu ilaca dirençli suşlara karşı etkinliği tam olarak bilinmemekle birlikte, in vitro çalışmalarda rifampisinin kolistinle veya sulbaktam ile birlikte kullanımının bu suşlara karşı sinerjik aktivite gösterdiği ve ağır infeksiyonlarda kombinasyonun yararlı olabileceği bildirilmiştir (231). Li ve ark. kolistin ve rifampisin kombinasyonunun kolistin duyarlı *A.baumannii* suşlarında sinerjistik etkili olduğunu bulmuşlardır (233). Başka bir çalışmada Pantopoulou ve ark. deneysel bir hayvan modeli çalışmasıyla, çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* infeksiyonunda rifampisinle birlikte uygulandıktan sonra kolistin aktivitesinde bir artış olduğunu göstermişlerdir (234).

Kolistin ve rifampisin kombinasyonu ile kolistin duyarlı *A.baumannii* grubunda %45, kolistin dirençli *A.baumannii* grubunda %30, *K.pneumoniae* grubunda ise %35 oranında bir sinerji saptanmış, imipenemde olduğu gibi indiferan ve antagonistik etki görülmemiştir.

Yine yapılan invitro çalışmalarda tigesiklinin *Acinetobacter*'e karşı kolistin etkisini arttırdığı gösterilmiştir (235). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada KPC üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi sekiz suşta (dört *K.pneumoniae*, iki *E.coli*, bir *Enterobacter cloacae* ve bir *Serratia marcescens*) tigesiklin, kolistin ve meropenem kombinasyonu in-vitro olarak zamana bağlı öldürme yöntemi ile incelenmiş, tigesiklin, kolistin ve meropenemin tek başına kullanımlarıyla etkili bir bakterisidal aktivite saptanmazken tigesiklin ve kolistin kombinasyonunun tüm suşlarda bakterisidal bir etki yaratarak sinerjistik etkinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. KPC üreten *K. pneumoniae* suşlarında kolistin monoterapisi, tigesiklin monoterapisi ve kolistin-tigesiklin kombinasyonu ile klinik başarı oranları %14, %60, %71 olarak bulunmuştur (236). Başka bir çalışmada ise karbapenem dirençli *K. Pneumoniae* bakteriyemisinde erken ölüm oranları (tedavinin ilk 7 günü içinde) kolistinle %22, tigesiklinle %40, her iki ilacın kombinasyonu ile %8 olarak bulunmuştur (220).

Kolistin tigesiklin kombinasyonu ise çalışmamızda en çok sinerjistik etki gösteren kombinasyon olmuş, kolistin duyarlı *A. baumannii* grubu ile

K.pneumoniae grubuna %80, kolistin dirençli *A.baumannii* grubuna %45 oranında sinerji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda kullanılan bakterilerden hiçbirisi tigesikline dirençli bulunmamıştır.

Sulbaktam *A.baumannii*'ye bakterisidal etkilidir ancak artan direnç nedeni ile tek başına kullanımından kaçınılmalıdır. Sulbaktamın kolistin ve meropenem ile başarılı kombinasyonları bulunmaktadır (237).

Çalışmamızda kolistin sulbaktam kombinasyonu *K.pneumoniae* grubuna %100 etkisiz bulunurken, kolistin duyarlı *A.baumannii* grubuna %15, kolistin dirençli *A.baumannii* grubuna ise %10 sinerjistik etkili bulunmuştur. Bu iki gruptan hiçbirine etkisiz bulunmamıştır.

Kolistinin rifampisin, minosiklin, seftazidim, imipenem ya da azitromisin ile kombinasyonlarıyla çoklu ilaca dirençli *A.baumannii*'ye karşı invitro sinerjistik etkiler saptanmıştır (222,228). Yine çoklu ilaca dirençli infeksiyonların tedavisinde polimiksin, sulbaktam kombinasyonuna doksisisiklin ya da minosiklinin de eklenebileceği yönünde öneriler bulunmaktadır (231).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarına karşı rutinde kullanılmasına alışık olunmayan antibiyotik kombinasyonlarının aktiviteleri değerlendirilmiş, çalışmada kullanılan dört *A.baumannii* suşuna karşı kolistin ve rifampisin kombinasyonu %100 sinerji göstermiştir. Kolistinin meropenem ve azitromisinle olan kombinasyonlarının üç *A.baumannii* suşuna karşı sinerjik etkili olduğu, kolistin ve doksisisiklin kombinasyonunun ise genellikle sinerjik ve aditif etki gösterdiği belirlenmiştir (238).

Bizim çalışmamızda da kolistin doksisisiklin kombinasyonunun tüm gruplara en çok aditif etki gösterdiği, kolistin duyarlı *A.baumannii* grubuna %45, kolistin dirençli *A.baumannii* grubuna %25, *K.pneumoniae* grubuna ise %30 sinerjik olduğu saptanmış, indifera etki ya da antagonizmayla karşılaşılmamıştır.

Kolistin dirençli *A.baumannii*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* suşlarına karşı kolistinle trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonunun in-

vitro etkisinin değeriendirildiği bir çalışmada kombinasyonun tüm suşlara karşı sinerjistik etki gösterdiği ve bakterisidal olduğu saptanmıştır (239).

Kolistin ve trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonu kolistin duyarlı *A.baumannii* suşlarına karşı %35, kolistin dirençli *A.baumannii* suşlarına karşı %20, *K.pneumoniae* suşlarına karşı ise %15 sinerjistik etkili bulunmuştur. Kolistin ve trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonu ile tüm bakterilere karşı en çok saptanan etki aditif etki olmuştur.

Literatürde kolistin kloramfenikol kombinasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte çalışmamızda bir de kolistin ile kloramfenikol kombinasyonu değeriendirilmiş, her iki *A.baumannii* grubuna karşı etkisiz olarak değeriendirilen bu kombinasyonun *K.pneumoniae* grubuna %25 sinerjistik etki, %60 da aditif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bunların dışında *A.baumannii* suşlarına karşı kolistinin glikopeptidlerle in-vitro sinerji oluşturduğu yönünde yayınlar da bulunmaktadır (240, 241).

Çalışmamızda değeriendirilen izolatlarda baskın klonların araştırılmamış olması nedeniyle sinerjik etki saptanan kombinasyonların merkezimizdeki çoğul dirençli bakterilerin ne kadarını kapsadığını söylemek řu an için mümkün görünmemektedir. Ancak yine de kombinasyonlarla sağlanacak etkinin daha çok suşa özel olması nedeniyle kombinasyon uygulanacak her hastada imkanlar dahilinde etkinin in-vitro araştırılarak değeriendirilmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

Çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilere bağlı infeksiyonların uygun tedavisi için daha fazla suşla ve farklı antibiyotik kombinasyonları ile yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla beraber bu çalışmada olduğu gibi tüm in-vitro çalışmaların in-vivo ortamı yansıtmadığı bilinmeli, kombinasyon tedavileri ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu in-vitro çalışmalar, hayvan deneyleri veya vaka gözlemlerine dayandığı için de bu çalışmalarda elde edilen veriler kontrollü klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

ÖZET

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ OLAN *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARI İLE GRAM NEGATİF ENTERİK BAKTERİLERDE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Toplumdan ve özellikle hastaneden izole edilen gram negatif bakterilerde özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artması ile antibakteriyel ilaçlara karşı artan direnç tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından bir tanesi haline gelmiştir.

Antibakteriyel ilaç direncinde artış görülen gram negatif bakteriler içinde *Acinetobacter* cinsinde *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae* ailesinde de *Klebsiella pneumoniae* suşları önemli bir yer tutmaktadır. Her iki bakteri grubu da sıklıkla hastane infeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gram negatif bakterilerdeki çoklu ilaç direncindeki artışla yeni antibakteriyel gelişimindeki artış paralel seyretmemektedir. Bunun sonucunda da bu bakterilerle oluşan infeksiyonlara uygun tedavi seçeneklerini bulmak giderek zorlaşmaktadır. Bu nedenle farklı tedavi protokolleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yine bu bakterilerin gerek nozokomiyal salgınlar oluşturarak gerekse tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirerek klinisyenlere yaşattıkları sıkıntılar ise hem kolistin gibi eski antibiyotiklerin kullanımını hem de antibiyotiklerin kombine kullanımını gündeme getirmiştir.

Bütün bu nedenlere dayanarak bu çalışmada; hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarlarımıza gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 20 tane kolistin duyarlı ancak çoklu ilaca dirençli, 20 tane kolistin ve çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* suşu ile 20 tane de hem genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) hem de karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşunda çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro etkilerinin E-test yöntemi ile değerlendirilmesi ve çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* enfeksiyonları ile GSBL ve karbapenemaz

salgılayan gram negatif enterik bakteri enfeksiyonlarında kullanılabilecek sinerjistik etkili kombinasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kolistinin trimetoprim-sulfametoksazol, rifampisin, doksisiklin, sulbaktam, imipenem, tigesiklin ve kloramfenikol ile olan kombinasyonlarının in-vitro etkileri E-test yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Aditif etki tüm bakteri gruplarında en çok elde edilen sonuç olmuştur. Hiçbir antibiyotik kombinasyonu ile antagonistik etki ortaya çıkmamıştır. Kolistin ve trimetoprim-sulfametoksazol, rifampisin, doksisiklin, imipenem ve tigesiklin kombinasyonları tüm gruplarda sinerjistik etkili bulunurken sinerjistik etki en çok kolistin-tigesiklin kombinasyonunda görülmüştür. Kolistin ile sulbaktam kombinasyonu sadece *A.baumannii* suşlarına, kolistin ve kloramfenikol kombinasyonu ise sadece *K.pneumoniae* suşlarına sinerjistik etki göstermiştir. Sinerjistik etki gösteren kombinasyonlar çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* enfeksiyonlarında alternatif tedavi seçenekleri olarak denenebilirse de çalışmamızın in-vitro koşullarda yapılan bir çalışma olduğu için in-vivo koşullarda aynı etkiyi göstermeyebilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak; tüm in-vitro çalışmaların in-vivo ortamı yansıtmadığı bilinmeli, bu çalışmaların sonuçlarını destekleyecek kontrollü klinik çalışmalar planlanmalı ve yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Çoklu ilaca direnç, *Acinetobacter baumannii*, *K.pneumoniae*, antibiyotik kombinasyonları, E-test yöntemi.

SUMMARY

EVALUATION OF SYNERGISTIC ACTIVITY OF VARIOUS ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* AND GRAM NEGATIVE ENTERIC BACTERIA

The increase of antibiotic resistance has become one of the most important health problems all over the world because of broad-spectrum antibiotic usage in community and especially hospital-acquired gram negative bacterial infections.

Gram negative bacteria that play important role in antimicrobial resistance are *A. baumannii* species in *Acinetobacter* genus and *K.pneumoniae* in *Enterobacteriaceae* family. Both of these microorganisms are common causes of nosocomial infections.

Increase in multi-drug resistance in gram-negative bacteria doesn't show the parallel increase in the development of new antibacterial agents. As a result of this, the appropriate treatment options for these bacterial infections is becoming increasingly difficult. For this reason, different treatment protocols are tried to be developed. The resistance to antibiotics which these bacteria develop during the treatment and nosocomial outbreaks has brought up the use of the old antibiotics like colistin and antibiotic combinations.

Because of these, in this study we aimed to evaluate the in-vitro activities of various antibiotic combinations against 20 colistin sensitive but multi-drug resistant *A.baumannii*, 20 colistin and multi-drug resistant *A.baumannii* and 20 extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing *K.pneumoniae* strains which were isolated from different specimens of the in-patients of our hospital by using E-test method and to detect the synergistic combinations which could be promising alternatives for the treatment of multi-drug resistant *A.baumannii* and extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing *K.pneumoniae* infections. To this end, the in-vitro activities of the combinations of colistin with trimetoprim-

sulfamethoxazol, rifampicin, doxycycline, sulbactam, imipenem, tigecycline and chloramphenicol were assessed by E-test method.

Additive effect was the most frequent result seen in all bacterial groups. There was not any antagonistic effect, observed with any combination of antibiotics. While the combination of colistin with trimetoprim-sulfamethoxazol, rifampicin, doxycycline, imipenem and tigecycline were syneygistic in all groups, the most synergistic effect was observed in colistin-tigecycline combination. Colistin-sulbactam combination was synergistic only in *A.baumannii* strains and colistin-chloramphenicol combination was synergistic only in *K.pneumoniae* strains. Although, the synergistic combinations could be promising alternatives for the treatment of multi-drug resistant *A.baumannii* and *K.pneumoniae* infections, our study conducted as an in-vitro study that's why these results can not show same effects in in-vivo conditions.

As a result, it should be known that all in-vitro studies don't reflect the in-vivo conditions, that's why the randomised controlled clinical trials which support the results of in-vitro studies should be planned and done.

Keywords: Multi-drug resistance, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic combinations, the E-test method.

7. KAYNAKLAR

1. Souli M, Gallani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug resistant and pan-drug resistant Gram negative bacilli in Europe. Eurosurveillance 2008, 13 (47):20.
2. Ferrara M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 183-95.
3. Wenzel RP. The economics of nosocomial infections. J Hosp Infect 1995; 31: 79-87.
4. Yalçın AN. Hastane infeksiyonları maliyet analizi. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitim etkinlikleri, Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi 2008; 60: 15-22.
5. Tatman-Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi. Ankem Derg, 2003; 17: 1-6.
6. Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Infect 2006; 53: 274-278.
7. Akalın H. Kolistin. ANKEM Derg 2007;21 (Ek 2):26-28.
8. Öztürk R. Akılcı antibiyotik kullanımı ve ülkemizde antimikrobik maddelere direnç sorunu. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitim etkinlikleri, Toplumdan edinilmiş infeksiyonlara pratik yaklaşımlar, Sempozyum Dizisi 2008; 61: 1-16.

9. Hanlon GW. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. Lett Appl Microbiol. 2005;41 (5):375-378.
10. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Euro Surveil 2008; 13: pii: 19044.
11. Mouloudi E, Protonariou E, Zagorianou A et al. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase / *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patient in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 1250–1256.
12. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148–65.
13. Javad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol 1998;1938–41.
14. Hilty M, Betsch BY, Bögli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Küffer M, Kronenberg A, Rohrer C, Aebi S, Endimiani A, Droz S, Mühlemann K. Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. Clin Infect Dis 2012 Jul 27.
15. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012 May 1;3 (3).

16. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L, Extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of Perinatology* (2003) 23, 439–443.
17. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* 2008;358 (12):1271-1281.
18. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal patojen olarak *Acinetobacter*'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1998; 2: 88-93.
19. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201.
20. Towner KJ. *Acinetobacter*. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9 th ed. London:1998;1229-1239.
21. Speller DCE, Humphreys H. Hospital-acquired infection. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. London: Arnold; 1998; 187–229.
22. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (9):4382-4390.
23. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.* and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol*.1994;32 (10):2353–8.

24. Schreckenberger PC, Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM press, 2003;749-779.
25. Cisneros JM, Rodriguez Barrio J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 687-93.
26. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 219–26.
27. Weaver R, Actis LA. Identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1994;32 (7): 1833-1838.
28. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (Eds.). *Principles and Practice Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churcill Livingstone Inc. 2010:2339–44.
29. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003;54 (1):39–45.
30. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilatör-associated pneumonia: epidemical and clinical findings. *Intensive Care Med* 2005;31 (5):649-655.

31. Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2941-2945.
32. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. *Flora* 1999; 4: 170–6.
33. Gür D, Gram negatif bakterilerde antibiyogram yorumu. *Ankem Dergi* 2002; 16: 174-177.
34. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 2006;129:102-109.
35. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinsitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 101-106.
36. Allen DM, Hartman BJ. *Enterobacteriaceae* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (Eds.). *Principles and Practice Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churcill Livingstone Inc. 2010.
37. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*,1999.
38. Murray P. R., Baron J. E, Jorgensen H.J, Landry L.M, Pfaller A.M. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed.,vol. 1, 2007;648-712.
39. Koneman, E.W, Allen, S.D, Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., “The *Enterobacteriaceae*, color atlas and textbook of diagnostic mikrobiyology” 5.edition, *Lippincott-Raven Publishers*,171-241 (1997).

40. Bilgehan H. "Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları", 9.Baskı, *Fakülteler Kitabevi*, İzmir, 56-64 (1996).
41. Özinel M. *Enterobacteriaceae*. Topçu A,Söyletir G, Doğanay M, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2008; 2126-2150.
42. Lawlor MS, HsU J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model, *Molecular Microbiology*, 2005; 58 (4): 1054-1073.
43. Podschun R, Ullman U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors *Clinical Microbiology Reviews*, 1998; 11 (4): 589-603.
44. Tarkkanen AM, Allen BL, Williams PH, et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun* 1992; 60: 1187-92.
45. Tunçkanat, F, "Üriner Sistem Enfeksiyonları Patogeneğinde Bakteriyel Virulans Faktörleri", *Klinik Dergisi*, 6: 3 (1993).
46. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P.Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*.*Infect Immun*. 2005 Aug;73 (8):4626-33.
47. Erdem B. Bakterilerde sideroforlar ve diğer demir alım sistemleri. *İnfek Derg* 1996; 10: 101-3.
48. Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 276:481-6.

49. Skippen E, et al. Epidemiology of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*: a nested case–control study from a tertiary hospital in London Original Research Article Journal of Hospital Infection, Volume 64, Issue 2, October 2006, Pages 115-123.
50. Toddar K, The normal bacterial flora of humans. Online textbook of Bacteriology 2012.
51. Garrouste-Orgeas M, Marie O, Rouveau M, Villiers S, Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: relationship with nosocomial infections and mortality. Journal of Hospital Infection Volume 34, Issue 4, December 1996, Pages 279–289.
52. Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, Nativ R, Riesenber K. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K.pneumoniae*. Original Research Article. American Journal of Infection Control, Volume 40, Issue 5, June 2012, Pages 421-425.
53. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. Emerg Infect Dis 2007; 13: 986.
54. Yang PY, Huang CC, Leu HS, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: community-acquired vs. nosocomial infections. Chang Gung Med J 2001; 24: 688.
55. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Am J Med 2009; 122:866.

56. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39: 309.
57. Parasakthi N, Vadivelu J, Ariffin H, Iyer L, Palasubramaniam S. Epidemiology and molecular characterization of nosocomially transmitted multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Original Research Article International Journal of Infectious Diseases, Volume 4, Issue 3, 2000, Pages 123-128.
58. Debby BD, Ganor O, Yasmin M, David L, Nathan K, Ilana T, Dalit S, Smollan G, Galia R. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Aug;31 (8):1811-7.
59. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, Dimopoulos G, Antoniadou A, Armaganidis A, Giamarellou H. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. Clin Microbiol Infect. 2011 Nov;17 (11):E9-E11.
60. Wang S, Li D, Chu YZ, Zhu LY, Liu FZ. Determination of oropharyngeal pathogenic colonization in the elderly community. Chin Med J (Engl). 2009 Feb 5;122 (3):315-8.
61. Gür D, Bakterilerde antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2008;243-256.
62. Yüce A, Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, Klimik Dergisi, 2001; 14, 41-46.

63. Doğanay M. Ünal S, Hastane Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003.
64. Arman D, Yoğun Bakımda Gram Negatif Bakteri Sorunu ANKEM Derg 2009;23 (Ek 2):148-156.
65. Murray B, “New Aspects of Antimicrobial Resistance and The Resulting Therapeutic Dilemmas”, Journal Infect Dis. 1991; 63: 1185.
66. Gür D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004: 69-82.
67. Resistance to antimicrobial drugs, Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical microbiology, 24th edition; 165-168.
68. Bartlett JG, Froggatt JW. Antibiotic resistance. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121: 392-6.
69. Akman M. “Bakteri Genetigi”, 2.Baskı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak. Yayını, Sivas, 1993; 122-126.
70. Pardesi K, Supriya P, Yavankar A, Plasmid distribution & antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter* genospecies from healthy skin of a tribal population in western India Indian J Med Res 125; 2007: 79-88.
71. Livermore DM. “Mechanisms of Resistance to Beta-Lactam Antibiotics”, Second Edition, Journal Infect Dis, 1991; Suppl 78: 7.
72. Gülay Z. “Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç”, Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 2001; 5: 210-229.

73. Siu LK. "Antibiotics: action and resistance in Gram negative bacteria".J Microbiol Immunol Infect, 2002; 35: 1-11.
74. Aydemir H, Yalçı A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R.*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ESBL üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Dergisi 2006; 19: 63-8.
75. Cohen FL, Tartasky D. Microbial resistance to drug therapy: a review. Am J Infect Control 1997; 25: 51-64.
76. Öncül O. Antibiyotikler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31,Kasım 2002; s. 23-38.
77. Yorgancıgil B. "Beta-Laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları". Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 1999; 6 (2): 177-182.
78. Mumcuoğlu İ, Gündüz T, Baydur H. "*Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu", Ankem Derg, 2004; 18 (1): 9-11.
79. Öztürk R. Penisilinler. İçinde: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel tıp yayınevi 2008;253-269
80. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance, Clin Microb Rev 1995; 8: 557-84.
81. Çakır N. Gram negatif etkili antibakteriyel ajanlar ve klinik kullanımları (antipsödomonal penisilinler). Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Usluer G, eds. Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004;399-408.

82. Vahaboğlu H. Beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktamlar. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;281-284.
83. Çakır N. Gram negatif etkili antibakteriyel ajanlar ve klinik kullanımları (sefalosporinler). Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Usluer G, eds. Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004;410-428.
84. Leblebicioğlu H. Parenteral Sefalosporinler. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;285-298.
85. Töreci K. Antibakteriyel Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;15-37.
86. Andes DR, Craig WA. Cephalosporins. In: Principles and Practice of Infectious Diseases Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (eds) 7th ed. Churchill Livingstone 2010; 323-39.
87. Aygün G, Dikmen Y, Mete B, Utku T, Murtezaoğlu A, Demirkıran O. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılığı. Ankem Derg 2002; 16: 85-8.
88. Stein RA, Goetz RM, Ganea GM. Ceftobiprole: a new beta-lactam antibiotic. Int J Clin Pract 2009; 63: 930-43.
89. Dauner DG, Nelson RE, Taketa DC. Ceftobiprole: a novel, broadspectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Health-Syst Pharm 2010; 67: 983-93.

90. Leblebicioğlu H. Polimikrobiyal İnfeksiyonlarda Tedavi ve Ampisilin-sulbaktam Kullanımı. Flora 2004;9 (Ek 2).
91. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activities of the beta lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strain. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1586–92.
92. Akova M. Sulbaktam-Sefoperazon: In Vitro Çalışmalar ve Klinik Kullanımında Yeni Veriler. Flora 2006;11 (Ek 2).
93. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211–1233.
94. Leblebicioğlu H. Polimikrobiyal İnfeksiyonlarda Tedavi ve Ampisilin-sulbaktam Kullanımı. Flora 2004;9 (Ek 2).
95. Fass RJ, Gregory WW, Dzamato RF, Matsen JM, Wright DN, Young LS. In vitro activities of cefoperazon and sulbactam singly and in combination against cefoperazone-resistant members of the family *Enterobacteriaceae* and nonfermenters. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2256-2259.
96. Öztürk R, Monobaktamlar, Türkiye Klinikleri Yayınevi Farmakoloji Özel Sayısı 2004; Cilt 2:Sayı:2.
97. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;39-52.

98. Thomson MJ, Bonomo AR. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 18–524.
99. Akova M. Beta-laktam antibiyotiklerin klinik kullanımı ve beta-laktamazlara bağlı direnç gelişimi. *Ankem Derg*, 1994; 8 (4): 305-310.
100. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. *Manual of Clinical microbiology*. Eighth ed. ASM Press, 2003: 1074-101.
101. Thomson MJ, Bonomo AR. The threat of antibiotic resistance in Gramnegative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:518–24.
102. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998; 1:38–45.
103. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Imipenem Resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4776–8.
104. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007; 39: 162-176.
105. Peleg AY, Adams J, Peterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2065-2069.

106. Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52 (9):2999-3005.
107. Xavier DE, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol*. 2010 Aug 12; 10: 217.
108. Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 259–263.
109. Gür D. Beta-laktamazlar. Ulusoy S (Editör). Beta- laktamazlar ve klinik önemi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2005. s.70–88.
110. Duttaroy B, Mehta S. “Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *K.pneumoniae* and *E.coli*”, *Indian J. Pathol Microbiol*, 48 (1): 45-48 (2005).
111. Joumana NS, Araj F.G. “Recent Developments in Beta Lactamases and Extended Spectrum Beta Lactamases”, *BMJ* 2003; 11: 327.
112. Gülay Z, İndüklenebilir beta-laktamazlar; özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi. Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi, Ulusoy S, ed. 2005:45-65.
113. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Feb;12 (2):123-30.

114. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49 (7):2941-8.
115. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52 (4):629-35.
116. Mederios AA. Beta-lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect* 1997;3 (Suppl 4):2-9.
117. Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, et al. "Clinical importance or extended spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains". *J. Medical Microbiology*, 50: 642-645 (2001).
118. Gür D. "GSBL'lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar". *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; 45-55.*
119. Stürenburg E, Mack D. "Extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control", *J.Infect*, 2003; 47: 273-295.
120. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. "Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar", *FloraDergisi*, 6 (1):3 (2001).
121. Gür D. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar. Ulusoy S (Editör). *Beta- laktamazlar ve klinik önemi.* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2005. s.70–88.

122. Phillippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
123. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X. Extended-spectrum beta-lactamases in producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1718-23.
124. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Chloee KW. Bloodstream Infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 4574–81.
125. Ali Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristic, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamase. *Research in Microbiology* 2004; 155: 409-21.
126. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18: 657-86.
127. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
128. Gür D, Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamazlar: Epidemiyolojisi ve tanı, Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar; 2009:83-100.
129. Samaha-Kfoury J, Araj GF. "Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases", *BMJ*, 327: 1209-1213 (2003).

130. Jasser-Al M. "Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem", Kuwait Medical Journal, 2006; 38 (3): 171-185.
131. Taşlı H, Bahar İH. "Molecular Characterization of TEM- and SHV-Derived Extended Spectrum Beta-Lactamases in Hospital-Based Enterobacteraceae in Turkey", J Infect Dis, 2005; 58: 162-167.
132. Bonomo AR, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006;43:49-56.
133. Turner PJ. Extended-Spectrum Beta-Lactamases. Clinical Infectious Diseases, 2005; 41 (4): 273-275.
134. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor resistance TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. J Antimicrob Chemoter, 1999; 43: 447-458.
135. Paterson D, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA. Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Klebsiella Pneumoniae* Bloodstream Isolates From Seven Countries: Dominance And Widespread Prevalence Of SHV And CTX-M Type Beta-Lactamases, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2003; 47: 3554-3560.
136. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J. "Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple- drug resistant *Acinetobacter baumannii*", Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 25 (5): 425–427 (2004).

137. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacterbaumannii* strain with a carbapenem-hidrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance in *A.baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. J Clin Microbial 2000; 38: 3299-3305.
138. Bonnet R. "Growing Group of Extended-Spectrum Beta Lactamases: theCTX-M Enzymes", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48 (1): 1-14.
139. Young D, Shin JA, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter spp.* in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1749-51.
140. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii*in Belgium. J. Antimicrob. Chemother, 2006;58: 178–182.
141. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ. Investigation of nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended spectrum beta-lactamase in an intensive care unit. J Hosp Infect 2005; 59: 242-48.
142. Colodner R. "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists". Am J Infect Control; 2005; 33 (2):104-107.
143. Kaçmaz B, Çakır ÖF, Aksoy A. Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması. ANKEM Derg 2005; 19: 125-129.

144. Chaudhary U, Aggarwal R. "Extended spectrum Beta-lactamases (ESBL)- An Emerging Threat to Clinical Therapeutics", Indian Journal of Medical Microbiology, 22 (2): 75-80 (2004).
145. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; update CLSI document M100-S20 June 2010 update Clinical and Laboratory Standards Institute.
146. Tanır G, Göl N: Antibiyotik direnci, Klimik Derg 1999;12 (2):47-54.
147. Çakır N. Karbapenemler. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;307-321.
148. Usluer G, Ünal S. İmipenem. Flora 2004;9 (Ek7):3-16.
149. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;39-52.
150. Siu, L. K, "Antibiotics: action and resistance in Gram negative bacteria", J. Microbiol Immunol Infect, 2002; 35: 1-11.
151. Budak S, Aktaş Z, Erdem H, Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvar dan Kliniğe Karbapenemazlar Derleme; <http://www.mjima.org/>.
152. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT- 1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother, 1997; 41 (3):563-9.

153. Bush K, "The Evolution of Beta Lactamases", Mikrobiyoloji Bülteni, 2000; (34):7-21.
154. Paterson D. L, "Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*", The American Journal of Medicine, 119 (6): 20-28 (2006).
155. Poirel R, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006;12: 826-836.
156. Gür D, "Temel Tıptan Kliniğe Beta Laktamazlar", Hacettepe Tıp Dergisi 33 (2): 102-109 (2002).
157. Bratu S, Tolane P, U Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005; 56, 128–132.
158. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306-325.
159. Moellering R. NDM-1, A Cause for Worldwide Concern. N Engl J Med 2010; 363:2377-2379.
160. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 583–8.

161. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. J Clin Microbiol 2002; 40: 4741-3.
162. Bradford PA. "Extended-spectrum Beta-Lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat", Clin. Microbiol Rev, 2001; 14: 933-951.
163. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. Clinical Microbiology Newsletter. 2009;31 (8):55-62.
164. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents. 2010;36 (3):205-10.
165. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2007;45 (8):2723-5.
166. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. Drugs. 2007;67 (7):1027-52.
167. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 2010;48 (12):4417-25.

168. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47 (12):3881-9.
169. Gilbert DN. Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.p.279–306.
170. Willke A. Aminoglikozidler. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008; 365-375.
171. Akalın H. Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. Doğanay M, Ünal S (Editörler). Hastane infeksiyonları. 1. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.269–89.
172. Pankey GA. Tigecycline. J Antimicrob Chemother 2005;56 (3): 470-80.
173. Parlak M. Tetrasiklinler. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. GüncelBilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;441-460.
174. Çalık N, Akova M. Tigesiklin. Ankem Derg 2007;21 (Ek 2):29-33.
175. Fritsche TR, Sader HS, Stilwell MG, Dowzicky MJ, Jones RN. Potency and spectrum of tigecycline tested against an international collection of bacterial pathogens associated with skin and soft tissue infections (2000-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52 (3): 195-201.
176. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? J Antimicrob Chemother 2005;56 (4):611-4.

177. Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R. In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside - modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 138–141.
178. Hooper GC. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.p.404–19.
179. Arda B, Ulusoy S. Kinolonlar. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;497-512.
180. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, Decrease daccumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1109-1117.
181. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez De Anta MT. Quinolone resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 757-62.
182. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61: 377-392.
183. Akbulut A. Sülfonamidler, Trimetoprim, Trimetoprim-Sülfametoksazol. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;461-477.
184. Loooveren MV, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 684–704.
185. Akalın H. Kolistin. Ankem Derg 2007;21 (Ek 2):26-28.

186. Falagas ME, Kasiakou SK: Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005;40 (9):1333-1341.
187. Owen RL, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 473-477.
188. Yemişen M, Özaras R. Kolistin. *Kolistin, Flora dergi* 2011;16 (Ek3):15-26.
189. Murray CK, Hospenthal DR. Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter*. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18 (6):502-506.
190. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1268-1274.
191. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH: Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52 (1):351-2.
192. Li J, Rayner C, Nation R, Owen R, Spelman D, Tan K.E, Liolios L. Heteroresistance To Colistin In Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2006;50 (9): 2946–2950.
193. Pachon-Ibanez ME, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J: Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48 (11):4479-4481.

194. Wood GC, Hanes SD, Boucher BA, Croce MA, Fabian TC. Tetracyclins fortreating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med 2003; 29: 2072-2076.
195. Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin respir Infect, 2002; 17 (3): 215-30.
196. Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV et al. Antibiotic therapy for *K.pneumoniae* bacteremia: Implications of extended-spectrum β -lactamases. Clin Infect Dis 2004; 39: 31-7.
197. Gioia SB, Yuan M, Hall LMC, Livermore DM: Variable susceptibility topiperacillin-tazobactam amongst *Klebsiella spp.* with extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 605.
198. Akova M. Sulbaktam-Sefoperazon: In Vitro Çalışmalar ve Klinik KullanımındaYeni Veriler. Flora 2006;11 (Ek 2).
199. Yıldız O. Antibiyotiklerin Kombine Kullanımı. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G,Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel TıpYayınevi 2008;127-137.
200. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38: 43–50.
201. Montero A, Ariza J, Corbella X,et al. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbepenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 1085-91.

202. Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin Infect Dis 2006; 43 (Suppl 2):95-9.
203. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. Clin Infect Dis 2008; 46: 1254-63.
204. Scheetz MH, Qi C, Warren JR, Postelnick MJ, Zembower T, Obias A. In vitro activities of various antimicrobials alone and in combination with tigecycline against carbapenem-intermediate or resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1621-6.
205. Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 494-5.
206. Papp-Wallace KM, et al. Early Insights into the Interactions of Different β -Lactam Antibiotics and β -Lactamase Inhibitors against Soluble Forms of *Acinetobacter baumannii* PBP1a and PBP3. Antimicrob agents Chemother, 2012; doi 10.1128/AAC 01027-12.
207. Pournaras S, Vronti G, Neou E *et al.* Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. Int. J. Antimicrob. Agents, 2011; 37 (3): 244–247.
208. Michalopoulos A, Vrtizili S, Rafailidis P, Chavelelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. Clin Microbiol Infect, 2010; 16: 184–186. (2010).

209. Endimiani A, Patel G, Hujer KM *et al.* In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54: 526–529.
210. Popovic M, Steinort D, Pillai S *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram negative non urinary bacteria to fosfomycin and other antimicrobials. *Future Microbiol*, 2010; 5: 961-970.
211. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. 13, pii 19044 (2008).
212. Zhanel GG, Decorby M, Laing N *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52 (4): 1430-1437.
213. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010; 31 (5): 528-531.
214. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62 (6):1261-4.
215. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20 (3):440-58.

216. Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S ve ark: 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci, ANKEM Derg 2007;21 (1):32-6.
217. Genç S, Benzonana N, Özer S ve ark: Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları, Yoğun Bakım Derg 2001;1 (2):131-7.
218. Karslıgil T, Balcı İ. Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direnci. *İnfek Derg* 2000; 14: 511-4.
219. Noordman P, Cuzon G, Naas T. The real treat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 2009; 9: 228-236.
220. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2010; 10 (4): 441-451.
221. Zavascki M, Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010; 29: 127-142.
222. Gazi H, Tünger Ö, Vural F, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S. Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına in vitro etkileri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2007; 37 (1): 11-14.
223. Haddad FA, Horn KV, Carbonaro C, Rosenfeld MA, Wormser GP. Evaluation of antibiotic combinations against multidrug - resistant *Acinetobacter baumannii* using the E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24: 577–579.

224. Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia complex* from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 28-34.
225. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 43–50.
226. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 60: 1206-1215.
227. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob agents Chemother*, 2009; 53 (8): 3430-3436.
228. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67 (7): 1607-15.
229. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection *J. Antimicrob. Chemother.* (2010) 65 (6): 1119-1125.
230. Lee J, Patel G, Huprikar S, et al. Decreased susceptibility To polymyxin during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1611-1612.

231. Yıldız O. Çoğul Dirençli Gram-Negatiflerde Tedavi Yaklaşımı; *Acinetobacter* Türleri. Yoğun bakım dergisi, 2007; 7 (1): 144-150.
232. Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Efficacy of colistin versus betalactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a Mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2002; 46:1946-52.
233. Li J, Nation RL, Owen RJ, et al. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains, *Clin Infect Dis*, 2007; 45: 594–8.
234. Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, et al., Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin, *Int J Antimicrob Agents*, 2007;29 (1):51–5.
235. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8, 18 (2009).
236. Pounaras S, Vioni G, Neou E, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37 (3), 244–247 (2011).
237. Guardado et al Multidrug-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. *J Antimicrob Chemother*. 2008

238. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27 (3): 224-8.
239. Vidaillac C, Lothaire Benichou L, Duval RE. In-vitro Synergy Of Colistin Combinations Against Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.05996-11; published ahead of print 2 July 2012.
240. M. Hornsey M, Wareham DW. *In Vivo* Efficacy of Glycopeptide-Colistin Combination Therapies in a *Galleria mellonella* Model of *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agen Chemother*,2011;55 (7): 3534–3537.
241. Wareham, D. W., N. C. Gordon, and M. A. Hornsey. 8 March 2011. *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multi-drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* (MDRAB). *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkr0