

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM OLUMSUZ
BASİLLERDE KARBAPENEM DİRENCİNİN
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Mümtaz GÜRAN

DOKTORA TEZİ

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

ADANA-2014

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM OLUMSUZ
BASİLLERDE KARBAPENEM DİRENCİNİN
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Mümtaz GÜRAN

DOKTORA TEZİ

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

**Bu çalışma TF2012D5 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA-2014

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım, tezimin belirlenmesinde ve yürütülmesinde büyük yardımlarını gördüğüm, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, danışman hocam Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı; Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, bilimsel vizyonumun gelişmesinde gösterdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Macit İLKİT'e, Prof. Dr. Fügen YARKIN'a ve Prof. Dr. Akgün YAMAN'a, çalışma dönemim boyunca aynı sıcak ortamı paylaştığım ve bana destek olmaktan hiçbir zaman kaçınmayan tüm çalışma arkadaşlarıma ve bölümümüz personellerine, sadece bu dönemde değil tüm hayatım boyunca sevgi, saygı ve desteklerini esirgemeyen hayattaki en değerli varlıklarım olan kardeşime, anneme ve babama, yıllardır hayatıma anlam katan en kıymetli insana, en içten duygularıyla sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Mümtaz GÜRAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. B-laktam Antibiyotikler	5
2.2. B-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	6
2.3. B-laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi	7
2.3.1. PBP`de Meydana Gelen Değişikliklerle Oluşan Direnç	8
2.3.2. Permeabilite Değişimleriyle Gelişen Direnç	9
2.3.3. B-laktamaz Enzimleriyle Gelişen Direnç	9
2.3.4. Antimikrobiyal bir hedef olarak Bakteriyel Hücre Duvarı	10
2.4. Beta-laktamazlar	10
2.4.1. Grup 1 Sefalosporinazlar	12
2.4.2. Grup 2 Serin Beta-Laktamazlar	12
2.4.3. Grup 3 Metallo-Beta-Laktamazlar	16
2.4.4. B-laktamaz Enzimlerinin Tarihçesi ve Evrimi	19
2.4.5. B-laktamaz Enzimlerinin İsimlendirilmesi	20
2.5. Karbapenem Grubu Antibiyotikler	21
2.5.1. İmipenem	21
2.5.2. Meropenem	23
2.5.3. Ertapenem	24
2.6. Karbapenemazlar	25
2.6.1. A grubu Karbapenemazlar	28

2.6.2. B Grubu Karbapenemazlar(Metallo Beta-Laktamazlar- MBL`ler)	29
2.6.3. D grubu Karbapenemazlar	33
2.7. Türkiye özelinde Karbapenemaz Epidemiyolojisi	34
2.8. Sonuç	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Merkezlerde karbapenem dirençli Enterobacteriaceae izolatlarının tespiti ve Ç.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bölümüne transportu	37
3.2. Test suşlarının mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısal olarak doğrulanması, Modifiye Hodge testi ile karbapenem direncinin gösterilmesive ileriki çalışmalar için stoklanması	38
3.2.1. Mikrobiyolojik Testler ve Besiyerleri	38
3.2.1.1. Gram Boyama	38
3.2.1.2. Macconkey Besiyeri	38
3.2.1.3. Endo Besiyeri	39
3.2.1.4. EMB Besiyeri	39
3.2.1.5. Oksidaz Testi	40
3.2.1.6. Katalaz Testi	40
3.2.2. Biyokimyasal Testler	40
3.2.2.1. IMVIC Testleri	40
3.2.2.1.1. İndol Testi	40
3.2.2.1.2. Metil Kırmızısı Testi	40
3.2.2.1.3. Voges-Proskauer Testi	41
3.2.2.1.4. Sitrat Testi	41
3.2.2.2. BD-CRYSTAL® Enteric/ Non-fermenter İdentifikasyon Testi	42
3.2.3. Modifiye Hodge Testi ile karbapenem direncinin doğrulanması	43
3.2.3.1. Mueller-Hinton Broth	44
3.2.3.2. Mueller-Hinton Agar	44
3.3. CLSI kriterlerine göre Disk Difüzyon metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi	44
3.3.1. Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi	46

3.3.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri	46
3.4. Moleküler çalışmalar için DNA eldesi ve PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu	48
3.4.1. Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve enzimler	48
3.4.1.1. TE Buffer	48
3.4.1.2. dNTP Karışımı	48
3.4.1.3. Marker	48
3.4.1.4. Taq DNA polimeraz enzimi	48
3.4.1.5. 10xTBE Solüsyonu	49
3.4.1.6. Etidyumbromid	49
3.4.2. DNA Eldesi	49
3.4.3. PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu	50
3.5. Çoğaltılan genlerin Dizi Analizi	55
3.5.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması	55
3.5.2. Dizi analizi çalışmaları	56
3.5.2.1. F.Sanger`indideoksi zincir sonlandırma yöntemi	57
3.5.3. Dizi Analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	60
4. BULGULAR	61
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. B-laktam halkasına göre antibiyotikler.	5
Şekil 2. Gram pozitif ve negatif bakterilerde hücre duvarının yapısı.	6
Şekil 3. Gram negatif bakteride β -laktamazların yer aldığı periplazmik aralık.	7
Şekil 4. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin mekanizması.	8
Şekil 5. Bazı klinik açıdan önemli β -laktamazın sağladığı direncin zaman içinde gelişen spektrumu.	20
Şekil 6. İmipenemin kimyasal yapısı.	22
Şekil 7. Meropenem`in kimyasal yapısı.	23
Şekil 8. Ertapenem`in kimyasal yapısı.	25
Şekil 9. NDM-1 sentezleyen izolatlar tüm dünyadaki popüler medya tarafından “Süper Mikrop” olarak adlandırılması.	30
Şekil 10. Metallo beta-laktamazların tüm dünyadaki yayılımını gösteren şema.	32
Şekil 11. IMVIC testinde pozitif ve negatif sonuç alınmış örnekler.	41
Şekil 12. BBL CrystalEnteric/Nonfermenter (E/NF) Identification (ID) System (Enterik/Fermente Etmeyen (E/NF) Tanımlama (ID) Sistemi).	42
Şekil 13. ModifiyeHodge Testi yapılmış iki izolatın görünümü.	43
Şekil 14. Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonucu test edilen bütün antibiyotiklere dirençli olduğu görülen bir test izolatı.	46
Şekil 15. DNA ölçümlerinin yapıldığı Spektrofotometre cihazı.	50
Şekil 16. Elektroforez işlemlerinin uygulandığı sistemler.	55
Şekil 17. Saflaştırma işlemlerinde kullanılan hazır SENTROMER® saflaştırma kiti.	56
Şekil 18. Normal bir dCTP molekülü ile bir dideoksinükleotid olan ddCTP molekülü	57
Şekil 19. Otomatize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları.	58
Şekil 20. Farklı ddNTP`lerin yaydığı floresansların analiz edilmesi sonucu bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrildiği örnek görüntü.	59
Şekil 21. Bölümümüzde Dizi analizi işlemlerinin gerçekleştirildiği ABI Prism 310 DNA sequencer (AppliedBiosystems) sistemi.	59

Şekil 22.	Klinik materyallerin dağılımını gösteren şema.	65
Şekil 23.	Bölüm laboratuvarımızda yapılan identifikasyon çalışmaları sonucu merkezlerden gelen örneklerin tür dağılımını gösteren şema.	66
Şekil 24.	Dört ModifiyeHodge Testi pozitif izolatın oluşturduğu yonca yaprağı görünümü	67
Şekil 25.	Acinetobacter kökenlerine ait 564bp`lik OXA-1-like ve 800 bp`lik TEM genlerine özgü bant profillerini gösteren jel görüntüsü.	73
Şekil 26.	Pseudomonas kökenlerine ait 520 bp`lik PER genlerine özgü bant profillerini gösteren jel görüntüsü.	74
Şekil 27.	Acinetobacter ve Pseudomonas kökenlerinde belirlenen 399 bp`lik GES enzimine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü.	74
Şekil 28.	Çeşitli kökenlere ait 281 bp`lik OXA-48 geninin bant profillerini gösteren jel görüntüsü.	75
Şekil 29.	Sol tarafta E. cloaceae sağ tarafta ise P. aeruginosa kökenlerinde tespit edilen 390 bp`lik VIM geninin bant profilini gösteren jel görüntüsü.	75
Şekil 30.	VIM-7 tipi karbapenemaz sentezleyen bir P. aeruginosa kökeninde yapılan dizi analizi sonucu elde edilen görüntü.	78
Şekil 31.	Yapılan BLAST taraması sonucu VIM-7 sub-tip belirlemesi yapılan P.aeruginosakarbapenemazı.	78

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. B-laktamazların sınıflandırılmasında kullanılan yöntemler	11
Tablo 2. B-laktamazlar ve genel özellikleri.	18
Tablo 3. Enterobacteriaceae ailesinde görülen karbapenemaz enzimleri, beta-laktam antibiyotiklerine karşı görülen hidroliz sektrumları ve inhibitör ajanlar.	27
Tablo 4. CLSI`ınEnterobacteriaceae için antibiyotik duyarlılık testlerinde Kullanılmak üzere belirlediği zon çapları.	45
Tablo 5. Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları.	47
Tablo 6. Multiplex-PCR`da kullanılan primerler.	52
Tablo 7. PCR`lakarbapenemaz genlerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan primerler.	54
Tablo 8. Örneklerin merkezlere göre dağılımı.	61
Tablo 9. 3 merkezden toplanan örneklere ait bilgiler.	62
Tablo 10. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklerekarşı elde edilen duyarlılık sonuçları.	69
Tablo 11. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının özeti ve direnç yüzdeleri.	72
Tablo 12. Multiplex-PCR sonucu kökenlerde amplifiye edilen beta-laktamaz genlerini gösteren tablo.	76
Tablo 13. Kökenlerde görülen beta-laktamaz enzim profilleri ve Dizi analizi yapılan karbapenemaz genlerinin sub-tip sonuçlarını gösteren tablo.	77

KISALTMALAR

AMP	: Ampisilin
B-laktamaz	: Beta laktamaz (β -laktamaz)
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu B-laktamaz
MBL	: Metallo B-laktamaz
AZT	: Aztreonam
bp	: Baz çifti
CAZ	: Seftazidim
CİP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinicallaboratory Standart Institute
CN	: Gentamisin
CPD	: Sefpodoksim
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
ÇDST	: Çift disk sinerji testi
dk	: Dakika
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FOX	: Sefoksitin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (Geniş Spektrumlu β -laktamaz)
HCl	: Hidroklorik asit
IMP	: İmipenem
L	: Litre
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Koloni Mukoid (Sümüksü) koloni
Mg	: Miligram
MHA	: Mueller-HintonAgar
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
Nmol	: Nanomol
PCR	: Polymerasechainreaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	: PulsedField Gel Electrophoresis
pH	: Power of Hydrogen (Asidite)
pI	: İzoelektrik nokta
pmol	: Pikomol
R Koloni	: Rough (Düzensiz) koloni

RFLP	: Restrictionfragmentlengthpolimorphism
SAM	: Ampisilin/sulbaktam
S Koloni	: Smooth (Düz) koloni
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Gram Olumsuz Basillerde Karbapenem Direncinin Moleküler Analizi

Gram negatif basillerde görülen karbapenem direnci tüm dünyada ve ülkemizde uzun yıllardır süren bakteriyel direnç probleminin son basamağıdır. Tedavide klinisyenlerin çoğu zaman çaresiz kaldığı karbapenem dirençli gram negatif basil infeksiyonlarında uzun vadede başarıya ulaşmanın tek yolu mikrobiyolojik yöntemlerle mekanizma ve epidemiyolojiyi aydınlatacak çalışmalar yapmaktır. Ülkemizde bu konuda yapılan araştırmalar çok sınırlı ve geniş bir sürveyans çalışması mevcut değildir.

Bu çalışmada çeşitli klinik infeksiyonlardan izole edilen karbapeneme dirençli olduğu belirlenen gram negatif bakterilerin fenotipik yöntemlerle çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi ve genotipik yöntemlerle dirence yol açan enzimlerin belirlenerek epidemiyolojik veriler sunulması amaçlanmıştır.

Çalışma sonunda; karbapenem dirençli gram negatif bakteri infeksiyonlarında güvenle kullanılabilecek tek antibiyotiğin kolistin olduğu, diğer antibiyotiklere karşı %50-100 oranında direnç olduğu görülmüştür. Karbapenem direncinin genotipik olarak analiz edilmesinden sonra tüm türlerde en baskın karbapenemaz genlerinin OXA-48 ve OXA-58 olduğu, non-fermenterler türlerinde GES ve PER genlerinin ayrıca Enterobacteriaceae türlerinde ise IMP, VIM ve NDM tipi genlerin karbapenem direncinden sorumlu karbapenemaz enzimleri olduğu belirlenmiştir. İzolatların %26.7'sinde ise direncin karbapenemazlar dışında kalan G.S.B.L. enzimlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Karbapenem, Karbapenemaz, CLSI, Dizi Analizi

ABSTRACT

Molecular analysis of Carbapenem Resistance in carbapenem resistant Gram negative Bacilli Isolated From Clinical Samples

Carbapenem resistance in Gram-negative bacilli seen all over the World and in our country is the last step of the long standing problem of bacterial resistance. The only way to achieve success in the long run in treatment of Gram-negative bacilli infections which clinicians often remain helpless is to make studies with microbiological methods to illuminate the mechanisms and epidemiology. In our country, research done on this subject is very limited and a surveillance study of wide range is not available.

In this study, it is aimed to determine the susceptibilities to various antibiotics with phenotypical methods and to present epidemiological data by determining the enzymes associated with resistance by using genotypical methods in carbapenem-resistant gram-negative bacteria isolated from a variety of clinical infections.

At the end of the study; it was seen that the only reliable antibiotic in infections caused by carbapenem resistant gram negative bacilli is colistin. After analysing the carbapenem resistance genotypically it is determined that, the most dominant carbapenemase genes among entire species are OXA-48 and OXA-58, GES and PER in non-fermenter species also IMP, VIM and NDM type genes are found to be responsible from carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. In 26.7% of the isolates it is determined that the resistance arises from E.S.B.L.'s out of carbapenemases.

KeyWords: Carbapenem, Carbapenemase, CLSI, DNA Sequencing

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisi ve profilaksisinde kullanılan, klinik tıp açıdan büyük taşıyan kemoterapotiklerdir. Antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesi ile enfeksiyon hastalıkların mortalite ve morbidite oranları dramatik olarak düşmüştür. Ancak antibiyotiklerin keşfiyle neredeyse eş zamanlı olarak, mikroorganizmalarda bu mucize moleküllere karşı görülen düşük oranlardaki direncin zaman içerisinde bu ilaçların irrasyonel kullanıma bağlı olarak global bir direnç problemine dönüşebileceği, günümüzde toksisite sınırlarında kullanım zorunluluğu yaşanan antibiyotiklerin bir süre sonra enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etkisini tamamen kaybedebileceği ve belkide insanlığın antibiyotik öncesi dönemle yeniden dönebileceği gerçeği biraz geç fark edilmiştir.

Bu yeni tehdit algısının klinikte tedavicevapsızlıklarına dönüşmesi korkusunun geciktirilmesi veya önlenmesi amacı ile ilk çözüm olarak yeni, daha geniş spektrumlu, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri güçlendirilmiş semi-sentetik veya sentetik yeni moleküllerin geliştirilmesi düşünülmüştür. Bu düşüncenin ilk yansımaları 1960'lı yıllarda başta makrolidler, aminoglikozidler ve kinolon grubu antibiyotikler olmak üzere çok sayıda yeni molekül veya derivatlarının keşfi veya üretilmesine sebep olmuştur. Ancak mikroorganizmaların enfeksiyon hastalıklarla ilişkisinin keşfedildiği ilk yıllarda bu canlı türünün hiçte hafife alınmaması gerektiği düşünen beyinlerce fark edilmiş, Luis Pasteur “Son sözü her zaman mikroorganizmalar söyleyecektir” veciz sözü ile bu ilkel canlı türü ile mücadelenin çok kolay olmayacağını ima etmiş, penisilini klinik kullanıma sunan Alexander Fleming (1945) ise Nobel ödülünü alırken yaptığı konuşmasında, laboratuvar ortamında kendilerini öldürmeye yetmeyen dozlarda penisiline belirli bir süre maruz kalan mikroorganizmaların bu moleküle karşı direnç kazanacaklarını ve aynı direncin vücutta da geçerli olacağını söylemiştir. Nitekim mikroorganizmalar çok uzun zaman dilimi içerisinde ciddi ve yoğun çalışmalar sonucu laboratuardan klinik kullanıma taşınan yeni moleküllere karşıda kısa sürede direnç geliştirerek “yeni daha geniş spektrumlu antibiyotikler yaratmak” düşüncesinin direncin üstesinden gelmeye yetmeyeceğini ortaya koymuştur. Nitekim 2000’li yıllarda üretilen yeni molekül sayısı 1990lı yıllarda üretilenlerden çok daha az sayıda gerçekleşirken

klirik 6rneklerden izole edilen çoklu ilaç direnci g6steren başta asinetobakterler olmak 6zere gram negatif çomaklar ile VRE gibi gram pozitif kokların insidansında 6nemli artılar kaydedilmiştir. Başlangıçta irrasyonel antibiyotik kullanımının g6r6ld6đ6đ, kurumsallaşmış antibiyotik politikaları ve denetim mekanizmaları oluşturamayan 6lkelerde ortaya çıkan bu yeni dirençli mikroorganizma epidemisi, iç, turizm veya zorunlu g6ler ile yaşanan insan hareketleri ile globalleşip pandemi haline d6n6řm6ř, bu yeni tehdit karşısında ortak tavır alınması zorunluluğu doğmuştur. Bu sebeple D6nya Sağlık 6rg6t6 (DS6) Genel Kurulu 1998 yılında 6ye 6lkelerin antibiyotik direncine karşı harekete geçmesi kararını almış; 2001 yılında antibiyotik direncinin kontrol altına alınmasına y6nelik DS6 Global Strateji'si yayınlanmıştır. DS6 Genel Kurulu'nun 2005 yılı raporlarında, antibiyotik direncini sınırlama konusunda kaydedilen ilerlemenin beklenenin altında kaldığına dikkat çekilerek, tedarikçi ve t6keticiler akılcı antibiyotik kullanımına çağırmıştır. Son olarak DS6 halk sağlığına y6nelik tehdidin 6nemine dikkat çekmek için, 2011 D6nya Sağlık G6n6n6n temasını antibiyotik direnci olarak belirlemiş ve direnç gelişimini durdurmak için t6m d6nyayı bu konuda d6ř6nmeye, harekete geçmeye ve sorumluluk almaya çağırmıştır.

Bu bağlamda, ulusal d6zenlemeler ve s6rveyans çalışmaları, d6nya genelinde antibiyotik direncinin kontrol altına alınması çabalarında kilit rol oynayacağı, ancak başarı için b6t6n ulusal ve uluslararası antibiyotik kullanımı kontrol programlarının aynı ciddiyeet içerisinde çalışmalarının gerekliliğine vurgu yapılmıştır. Bu erevedesadece beşeri tebabette değil, veteriner hekimlik, tarım ve besicilik ile tekstil sekt6r6n6 de kapsayacak şekilde antibiyotik kullanımını rasyonelize edecek ortakkontrol programların hazırlanmasını, programa uyumun denetlenmesi, dirençli suşların epidemiyolojik 6zellikleri ve direncin mekanizmaları tespit edilerek gerekli hallerde kısıtlı antibiyotik kullanımının sağlanması, bu amaçla denetim ve laboratuvar kapasitelerinin artırılması, temel ve etkisi ispatlanmış ilaçlara kesintisiz erişimin sağlanması, halkın antibiyotik kullanımı konusunda bilinçlendirilmesi, uygun hasta bakımıyla birlikte antibiyotiklerin akılcı kullanımlarının d6zenlenmesi, tedavi hizmetlerinin yanı sıra enfeksiyon hastalıklarının 6nlenmesi ve kontrol altına alınması çabalarının daha etkili hale getirilmesi ve nihayet yeni ilaçların geliştirilmesine y6nelik AR-GE çalışmalarının s6rd6r6lmesi, başarının temel stratejisini oluşturmaktadır.

Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, hedef antibiyotiğin bilinen bir mikroorganizmaya karşı belirli bir dozda oluşturduğu etkinin aynı dozda tekrarlayan kullanımlarından sonra azalması veya aynı etkiyi oluşturmak için daha yüksek dozda kullanılmasının gerekliliği, olarak tanımlanmaktadır. Dirençli bakteri ise in-vivo şartlarda bakterisidal veya bakteristatik etki göstermesi beklenen antibiyotiklerin selektif toksisite sınırındaki dozlarına rağmen üremeye ve yaşamaya devam eden patojeni tanımlamak amacı ile kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar arasında antibiyotik direncin mekanizması ve ilişkili genlerin tespitine yönelik çalışmalar aslında direnç genlerinin ve bazı antibiyotiklere karşı direncin antibiyotikleri kullanmaya başlamalarından çok daha önce de, düşük oranlarda da olsa, bakteriler arasında görüldüğünü olduğunu ortaya koymuştur. Direncin mekanizmalarını tespitiye yönelik bu çalışmalarda bakterilerde direnç gelişiminden sorumlu olan genlerin yapısal olabileceği gibi indüklenen mutasyonlarla veya başka bakterilerden transfer edilerek kazanılabileceği de gösterilmiştir. Antibiyotiklere maruziyet durumunda duyarlı bakterilerin eradike edilmesine karşılık, direnç genlerini taşıyan bakteriler çoğalmaya devam ederek mikrobiyal ekosisteme hakim olurlar. Bu sonuç pre-antibiyotik dönemde de görülen antibiyotik direnç mekanizmalarının aslında bakterilerin evrimsel sürecinin bir parçası olarak kabul edilmesi gerektiği ve antibiyotik direncinin gelecekte de irreversible mutasyonlar ile genişleyerek süreceği, sonuçta direnç gelişmeyecek hiçbir antibiyotiğin olamayacağı göz önüne alınarak antibiyotik direncinin kontrolü stratejilerinin bu varsayım üzerinden kurgulanması gerektiği ileri sürülmüştür.

Son yıllarda klinik örneklerden izole edilen dirençli suşlar ile yapılan çalışmalarda, bakterideki çoklu ilaç direncinin yanısıra, tüm bakterilerdeki direnç faktörlerinin toplamından oluşan ve “rezistom” adı verilen direnç havuzu kavramına dikkat çekilmiştir. Bu havuzda sadece patojen bakteriler değil non-patojen bakteriler de yer almaktadır. Bu yeni tanımlama, bakterilerin direnç genlerini horizontal olarak farklı bakteri türlerine de aktarabilme yeteneklerini sebebi ile yapılmıştır. Özellikle enterik bakteriler gibi gram negatif bakterilerde görülen çoklu antibiyotik direncini kodlayan ve tür farkı gözetmeksizin plazmid veya transpozonlar ile bakteriler arasında kolaylıkla yayılan genler, direncin kontrol altına alınmasını güçleştirmekte ve mortal enfeksiyonların insidansında artışa sebep olmaktadır. Rezistomun iyi anlaşılması ve dikkate alınmasının, hem bu gün yaşanan hemde gelecekte yaşanacak direnç

problemlerinin daha akılcı irdelenmesine ve yeni antibiyotiklerin yaratılması sürecine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Antibiyotiklere karşı direnç gösteren bakterilerin sorumlu olduğu toplum ve özellikle hastane kökenli enfeksiyonlar tüm dünyada en önemli sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Başta Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vankomisine Dirençli Enterokoklar (VRE) ve çoklu dirençli gram negatif çomaklar olmak üzere çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmalar, Tıpta yaşanan gelişmeler ile tezat oluşturan, tedavide başarısızlıklar yaşanan yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara yol açmaktadır. Direnç tehdidinin mikroorganizma tehdidinin önüne geçtiği günümüzde direncinin mekanizmalarını ve epidemiyolojisini irdeleyen çalışmaların sayısı artmıştır. Bu bağlamda en sık karşılaşılan ve üzerinde en çok çalışılan direnç mekanizması, enzimatik hidroliz yolu ile ortaya çıkan dirençtir. Daha 1950'li yılların başlarında beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç ile ilgili olan ve top literatürüne β -laktamazlar adı ile geçen enzimlerin önemi gösterilmiştir. β -laktamazlar önceleri daha dar spektrumu olmalarına rağmen bu enzimlerin bazı modifikasyonları günümüzde neredeyse bütün β -laktamlara ve sefalosporin ve karbapenemlere karşı kazanılan dirençle ilişkilendirilmişler ve Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar ismi ile anılmaya başlamışlardır. Sonuç olarak günümüzde insanlığın bakterilere karşı verdiği savaşta elindeki en son silah karbapenem grubu antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklere direnç sağlayan Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz enzimlerine ise karbapenemaz denilmektedir. Karbapenemazlar bazen klinisyenlere tedavide seçenek bırakmayacak kadar tehlikeli olabilen, direnç spektrumu çok geniş olabilen enzimlerdir ve günümüz de en yoğun çalışılan direnç türüdür. Ancak ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sayısı çok azdır.

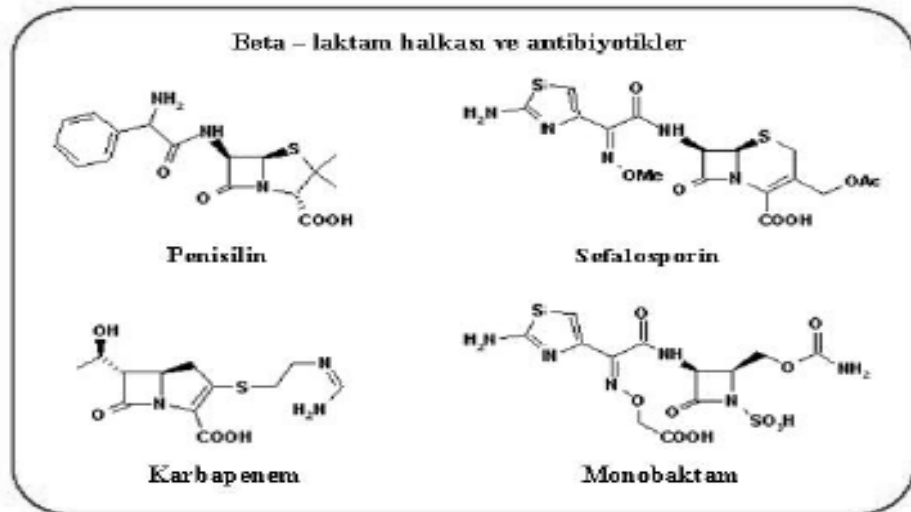
Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen gram negatif çomaklarda görülen karbapenemaz enzimlerinin direnç profilinin fenotip olarak gösterilmesi ve bu enzimleri kodlayan genlerin genotipik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışma ile lokal olarak karbapenemaz direncinin sürveyansı yapılırken ülkemize epidemiyolojik veriler kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. B-laktam Antibiyotikler

Penisilinlerin keşfinden 60 yılı aşkın süre geçmesine rağmen β -laktam antibiyotikler, günümüzde birçok hastalığın tedavisinde vazgeçilmezliğini korumaktadır¹. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren düşük toksisiteli β -laktam antibiyotiklerde biri azot, üçü karbon olan dört üyeli β -laktam halkası bulunur. Monobaktamlar hariç bu ana halkaya 6-aminopenisilanik asid (6-APA) adı verilen ikinci bir halka eklenmiştir. Günümüzde, 6-APA molekülüne yan zincirler eklenmesi ile farklı moleküler yapı ve etkinlikteki 5 ana grup β -laktam antibiyotik elde edilmiştir^{1,2}.

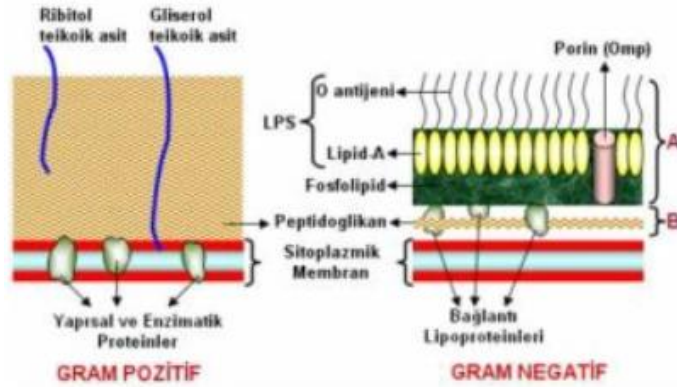
- 1- Penisilinler
- 2- Sefalosporinler
- 3- Monobaktamlar
- 4- Karbapenemler
- 5- B-laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam)



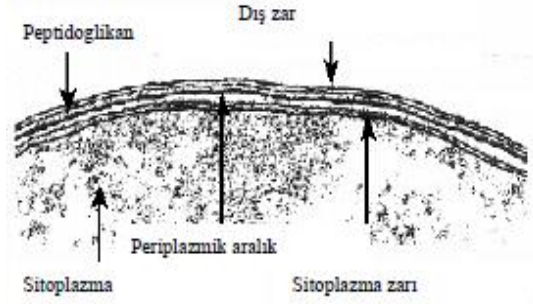
Şekil 1. B-laktam halkasına göre antibiyotikler³.

2.2. B-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

B-laktam antibiyotikler hücre zarları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu olan transpeptidazlar veya penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olarak tanımlanan proteinleri bağlayarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler.^{3,4} Peptidoglikan tabaka, bakteri hücre duvarının asıl polimeridir ve hücre duvarına şeklini vererek iç ve dış ortamdan kaynaklanan yaklaşık %20 sükröz konsantrasyonuna denk ozmotik basınca karşı bakteri bütünlüğünü korur (Şekil 2). β -laktamlar pentapeptid yan zincirdeki köprüyü bağlayan D-alanyl-D-alanine transpeptidase aktivitesini, enzimin aktif serin tarafındaki hidroksil grubunda, stabil esterler oluşturacak şekilde açilleyerek inhibe etmektedir⁵. Bu durumda bakteri hücre duvarındaki kros bağlanma sağlanamamakta ve ozmotik direnç kaybı ve lizis ortaya çıkmaktadır. β -laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için Gram-negatif bakterilerde porin (Outer Membrane Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazma zarı ile dış zar arasındaki periplazmik boşlukta yer alan β -laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir⁴ (Şekil 3). Gram-pozitif bakterilerde ise dış zar bulunmayıp, sitoplazma zarının üzerinde kalın bir peptidoglikan tabakası uzanmaktadır. B-laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadır⁴.



Şekil 2. Gram pozitif ve negatif bakterilerde hücre duvarının yapısı⁶.



Şekil 3. Gram negatif bakteride β -laktamazların yer aldığı periplazmik aralık⁶ .

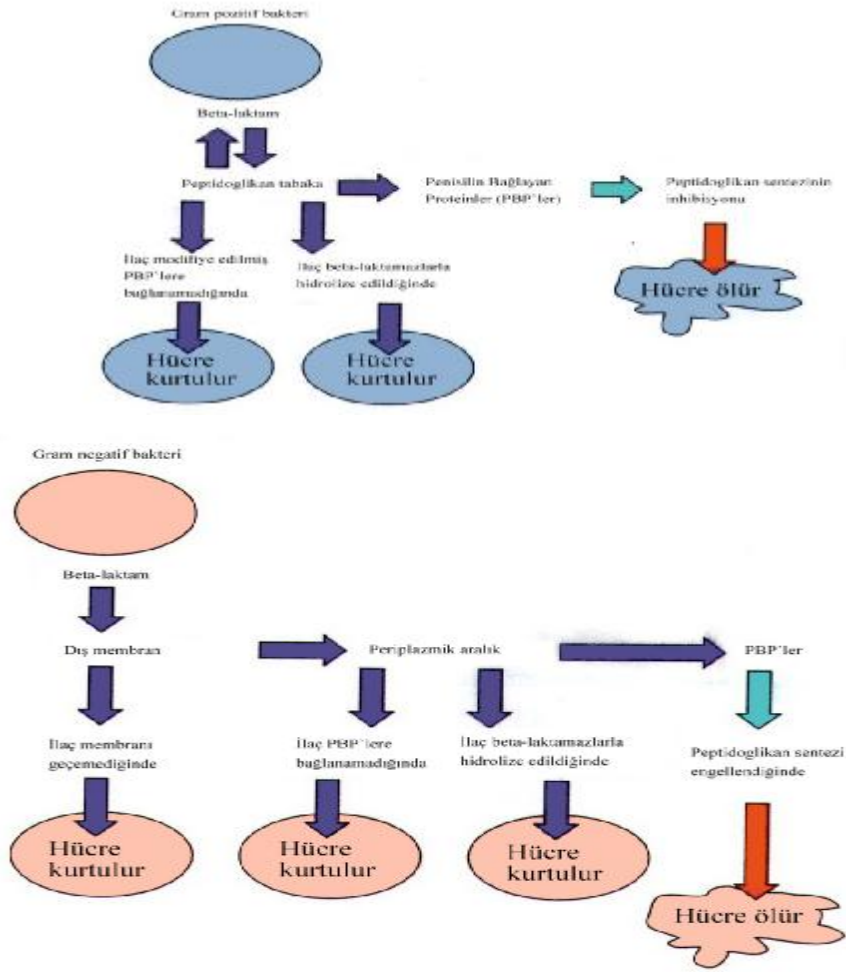
2.3. B-laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi

Bakteriler beta laktam antibiyotiklere 3 mekanizmayla direnç geliştirebilirler.

Bunlar:

- 1- PBP`de Oluşan Değişikliklerle Oluşan Direnç
- 2- Permeabilite Değişimleriyle Gelişen Direnç
- 3- β -laktamaz Enzimleriyle Gelişen Direnç

Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direncin major mekanizması bakteriler tarafından üretilen β -laktamaz enzimidir³. Burada β -laktamaz enzimine bağlı olarak gelişen direnç daha detaylı anlatılacaktır.



Şekil 4. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin mekanizması⁷.

2.3.1. PBP'de Meydana Gelen Değişikliklerle Oluşan Direnç

Bu direnç kromozomal mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu ya PBP'nin β -laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması yolu ile, ya PBP sayısında azalma olması veya β -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'nin sentezlenmesiyle olur⁷.

Bakterilerde iki grup PBP belirlenmiştir. Birincisi, düşük molekül ağırlıklı PBP (DD-karboksi-peptidazlar), ikincisinde yüksek molekül ağırlıklı PBP'dir (transpeptidaz ve transglikolizas)⁸. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'deki değişime bağlı oluşan penisilin direnci gram pozitiflerde gram negatiflere oranla daha fazladır⁹.

Gram pozitif koklarda PBP modifikasyonu ve by-pass edilmesi en önemli direnç mekanizmalarıdır¹⁰. Gram negatif mikroorganizmalarda bu mekanizma daha az yaygındır.

2.3.2. Permeabilite Değişimleriyle Gelişen Direnç

Gram negatif bakterilerde β -laktam molekülleri periplazmik alana OMP olarak tanımlanan, porin proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçer. Porinlerin özellikleri, porinlerin sayıları ve antibiyotiğin yük, çözünürlük, büyüklük gibi özellikleri hücre içine giriş hızını ve antibiyotiğin reseptöre ulaşarak etkinliğini gösterebilmesini belirler¹¹.

β -laktam antibiyotikler dış membrandan Porin F ve Porin C adı verilen iki kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış zardan geçişte ayrıca D2 porini adı verilen özel bir porinide kullanır. Dolayısıyla bir Gram-negatif bakteri Porin F ve Porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm β -laktamlara direnç geliştirebilirken imipenem duyarlı kalır⁵. *E. coli* için β -laktam antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri önce Porin C sonra da Porin F'nin kaybı sonucu gelişmektedir. Büyük porları olması sebebiyle Porin F en büyük etkiye sahiptir¹².

Gram-pozitif bakterilerde dış zar olmadığından bu mekanizma ile direnç gelişmesi söz konusu değildir. Çoğu zaman bir bakteride birden fazla mekanizma dirençten sorumlu olabilir⁵.

2.3.3 B-laktamaz Enzimleriyle Gelişen Direnç

Bakteriler tarafından üretilen β -laktamazlar β -laktam antibiyotiklerdeki β -laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir¹².Günümüzde 200 farklı β -laktamaz enzimi bildirilmiştir. Bu β -laktamazlardan bazıları penisilinlere (penisilinazlar) ve bazıları da sefalosporinlere (sefalosporinazlar) spesifik etki gösterirken, bazıları ise özellikle geniş spektrumlu sefalosporinler olmak üzere çoğu beta laktam antibiyotiği inaktive edebilme yeteneğine, yani daha geniş spektrumlu (G.S.B.L.) aktiviteye sahiptir. G.S.B.L.'ler sıklıkla plazmidler üzerinde kodlanır ve organizmalar arası mobilite yeteneği olduğu için kısa sürede türler arasında yayılma eğilimi gösterir¹³.

Gram-pozitif bakteriler içinde β -laktamaz sentezleyen en önemli patojen *S. aureus*'dur. *S. aureus* enzimleri plazmid'de kodlanır ve bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı hücrelere geçebilmektedir. Gram-negatif bakterilerdeki β -laktamazlar ise kromozom ya da plazmid kontrolünde sentezlenmekte ve periplazmik alanda depolanmaktadır⁵.

2.3.4. Antimikrobiyal bir hedef olarak Bakteriyel Hücre Duvarı

Bakterilerin hücre duvar yapıları antimikrobiyal ilaçların hedefinde olan özgün yapılardır. Hücre duvarı biyosentezi veya hücre bütünlüğünü hedefleyen pek çok antimikrobiyal ajan verimli ve güvenli bir şekilde 1940`lı yıllardan beri kullanılmaktadır^{14,15}. Diğer antibiyotiklerden farklı olarak, memelilerde benzer bir yapı olmadığından bu tür ilaçlar bazı hedefle ilişkisiz yan etkilerle birlikte yüksek spesifikite oranları sunmaktadır¹⁶. Ayrıca bu ilaçlar çoğunlukla bakterisidal etki gösterdiğinden özellikle ciddi infeksiyonlarda mikroptan tamamen temizlenme fırsatını sunmaktadır¹⁶.

Hücre duvarını hedef alan antibiyotiklerin çoğu toprak gibi doğal ortamlardan izole edilen ve ticari olarakta başarılı olabilen antibiyotikler veya başarılı analoglar sentezleyen izolatlardan elde edilmektedir¹⁶. Bu ilaçlar β -laktam sınıfından olan Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, Monobaktamlar veya günümüzde çoklu-ilaç dirençli bakteri infeksiyonlarında elde edilen tek seçeneklerden olan, doğal yollarla elde edilen katyonik peptidler olan polimiksin ailesine dahil olan ilaçlardır. Diğer ilaç gruplarında gözlenen dirençte göz önüne alındığında insanlığın yeni jenerasyonantibiyotiklerin oluşumunda doğal olan bileşiklere yönelmesi gerektiği açıktır. Bunun yanında günümüzde sıklıkla karşılaşılan “Tedavi-edilemez infeksiyonlar”a karşı geliştirilecek yeni antibiyotiklerde hücre duvarının çalışma mekanizmasının ve burayı hedefleyen ilaçlarla olan etkileşiminin iyi analiz edilmesi gerekmektedir¹⁶.

2.4. B-laktamazlar

B-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu farklı substrat özgüllüğü gösteren çok çeşit ve sayıda β -laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Bu enzimlerin sayısının artmasına bağlı olarak farklı zamanlarda farklı sınıflandırma şemaları kullanılmıştır. En yaygın kabul gören şema 1960`larda Richmond ve Sykes tarafından yapılmıştır. Zamanla bu şemada hatalar ve eksiklikler görülünce, şema, 1989`da Karen ve Bush tarafından değiştirilmiştir. Bush-Jacoby-Medeiros ise 1995 yılında yeni bir uyarlama ile yeni şema geliştirmişlerdir. Moleküler düzeydeki mekanizmalara dayanan sınıflandırmanın ilk temelleri ise 1980 yılında Ambler tarafından atılmıştır. Amino asit dizilerine dayanılarak yapılan bu moleküler sınıflandırmada β -laktamazlar A,B,C ve D olmak üzere dört grupta toplanmıştır. A,C ve D grupları serin enzimleri içermekte, B

grubunda ise çinko enzimleri bulunmaktadır. Her dört sınıfında kromozomal ve plazmid kökenli temsilcileri bulunmaktadır¹⁰. A sınıfı serin penisilinazları, B sınıfı metallo-enzimleri, C sınıfı serin sefalosporinazları ve D sınıfı oksasilini hidrolize eden serin β -laktamazları içermektedir²⁰. Klinik olarak en önemli β -laktamazlar A ve C sınıfına aittir.

Bush tarafından önerilen şemada ise, hem plazmid hem de kromozomal özellikli enzimler vardır. Bu sınıflandırmada enzimler önceki sınıflandırmalarda kullanılan substrat profili, inhibitör profili, molekül ağırlığı ve izoelektrik nokta gibi fiziksel özelliklere, oksasilin, sefoksitin, nitrosefin, ve tazobaktam ile inhibisyon da eklenerek 4 grupta toplanmıştır (Tablo 1).

Gram negatif bakterilerde β -laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en sık β -laktamazlarla sağlanan direnç görülür¹⁷. Penisilin, Karbapenem veya Sefalosporinler gibi β -laktam antibiyotikler infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanıldığı için bu enzimlerin varlığı ve karakterinin anlaşılması tedavide son derece önemli bir basamaktır.

B-laktamazların sınıflandırılmasında enzimlerin ya fonksiyonel karakteristiklerinden yada primer yapılarından faydalanılır¹⁸⁻²⁰. En basit sınıflandırma yöntemi ise protein dizilerine göre yapılan ve β -laktamaz enzimlerinin 4 moleküler sınıfa (Moleküler sınıf A, B, C ve D) ayrıldığı sınıflandırmadır. A, C ve D sınıfı enzimler substratlarını serin aktif sitesinde bir açıl enzimi oluşturarak hidrolize ederken B sınıfı enzimler bu hidrolizasyonu aktif sitesindeki çinko iyonu ile yapmaktadırlar. Yapısal sınıflandırma daha basit olmasına rağmen fonksiyonel sınıflandırma tedaviye yönelik yardımcı fikirler sunması açısından daha faydalıdır¹⁷.

Tablo 1. B-laktamazların sınıflandırılmasında kullanılan yöntemler

Molekül sınıfı	1989 grubu	Bush,-Richmond-Sykes	Bush-Jacobs-Medeiros
C	1	Ia, Ib, Id	1
A	2a	Yok	2a
A	2b	III	2b
A	2b	Yok	2be
A	Yok	Yok	2br
A	2c	II, V	2c
D	2d	V	2d
A	2e	Ic	2e
A	Yok	Yok	2f
B	3	Yok	3
ND	4	Yok	4

2.4.1. Grup 1 Sefalosporinazlar

Grup 1 enzimler moleküler olarak C sınıfında yer alan Sefalosporinaz enzimleridir. Bu enzimler çoğu *Enterobacteriaceae* ve başka mikroorganizmaların genellikle kromozomlarında kodlanmaktadır. Benzilpenisilinlere göre Sefalosporinler üzerinde daha aktif olan bu enzimler genellikle Klavulanik asit inhibisyonuna dirençlidirler ve Sefoksitin gibi Sefamisin`lere karşıda aktiftirler. A sınıfı sefalosporinazlarla karşılaştırıldığında bu enzimler Aztreonam`a karşı yüksek bir afinite gösterirler.

Citrobacter freundii, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi pek çok mikroorganizmada AmpC ekspresyonu azdır ancak β -laktamla karşılaşıldığında ekspresyon indüklenebilmektedir²¹⁻²⁴. *A. baumannii* ve *E. coli*`ninde dahil olduğu diğer bazı bakterilerde bir veya birkaç indüksiyon sistemi eksiktir. Özellikle az miktarda β -laktam antibiyotikle karşılaşıldığında, bu tür enzimler yüksek miktarda sentezlenirse başlıca ertapenem olmak üzere karbapenemlere direnç gösterebilirler²⁵⁻²⁷. Plazmid aracılı grup 1 enzimler olan CMY, ACT, DHA, FOX, MIR ve diğer bazı enzimler 1989`dan beri bilinmelerine rağmen plazmid aracılı 2be grubuna dahil enzimlerden daha az görülmektedirler<sup>28</sup>. Yeni subgrup 1e`ye dahil olan enzimler grup 1 varyantlarıdır ve bazı amino-acid eksilmeleri, insersiyonlar veya delesyonlar sonucu seftazidim ve diğer oksimin- β -laktamlara karşı daha yüksek aktivite göstermektedirler²⁹. Bu enzimler geniş spektrumlu AmpC enzimleri (ESAC) olarak bilinirler ve *E. cloacae*`deki GC1 ve CMY-10, 19, 37 bunlara dahildirler<sup>17</sup>. Bunlara ek olarak bir çalışmada *P. aeruginosa*`daki bir AmpC varyantında imipeneme artmış aktivite bildirilmiştir³⁰. Ancak klinik olarak anlamlı dirençte en önemli etken porin mutasyonlarıdır³¹.

2.4.2. Grup 2 Serin B-Laktamazlar

Fonksiyonel grubu 2 olan bu β -laktamazlar, moleküler sınıf A ve D içerisinde yer alırlar ve β -laktamazların en büyük grubunu oluşturmaktadırlar¹⁷.

Subgrup 2a penisilinazları ise β -laktamazların küçük bir grubunu oluşturmakta ve sıklıkla gram (+) koklarda sınırlı bir hidrolitik aktivite ile beraber görülmektedirler³². Bu enzimler daha çok benzilpenisilinler ve diğer penisilin türevlerini iyi hidrolize ederken sefalosporinler, karbapenemazlar veya monobaktamlara karşı <%10 düzeyinde

hidrolize edebilirler. Subgrup 2a enzimleri için istisnai bir durum sadece nitrosefinin hidrolizinde söz konusudur. Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktam ile kolayca inhibe edilebilmektedirler. Stafilokoklardaki bazı penisilinazlar dışındaki bu enzimlerin çoğu kromozomal kökenlidirler ve 1995 yılında 20 farklı türe sahip olan bu grup 2009 yılında sadece 5 farklı türle sayısını 25'e yükseltmiştir¹⁷. Bu duruma sebep olarak son dekatta klinikte kullanılan antibiyotik seçeneklerine karşı bu enzimlerin yeterli hidrolitik aktiviteyi gösterememiş olması düşünülebilir.

Subgrup 2b'ye dahil olan β -laktamazlar penisilinleri ve sefalotin, sefaloridin gibi erken sefalosporinleri doğal olarak hidrolize etmekte, klavulanik asit ve tazobaktam tarafından güçlü bir şekilde hidrolize edilebilmektedirler¹⁷. Bu grupta 1970 ve 1980'lerde identifiye edilen TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi enzimler dahildir^{33,34}. Özellikle 1995'teki β -laktamaz patlamasından sonra en az 9 TEM ve 29 SHV 2b grubu enzim tanımlanmış ve bunların özellikle sıradışı dirençli izolatlarda diğer β -laktamazlar araştırılırken ortaya çıktığı bilinmektedir¹⁸.

Subgrup 2be ise GSBL enzimlerini içermektedir. Bu geniş spektrumlu enzimler 2b subgrubundaki enzimlerin penisilin ve sefalosporinlere gösterdiği dirence ek olarak bir veya daha fazla oximinio-sefalosporin (sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi) grubu antibiyotikide hidrolize edebilmektedir. Subgrup 2be'de ilk ve en büyük oluşum TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'de görülen aminoasit değişimleri ile spektrumun genişlemesi ve benzilpenisilinlerle sefaloridinlere karşı hidrolitik aktivitenin azalması şeklinde gerçekleşmiştir³⁵. Böylece TEM ve SHV enzimleri birleşerek *Kluyvera* türlerinde doğal olarak görülen CTX-M tipi enzimleri oluşturmuşlardır³⁶. Bu CTX-M enzimleri isimlerinden de anlaşılabilir gibi sefotaksimi seftazidime kıyasla daha iyi hidrolize edebilmeleriyle karakterizedir. Çoğu seftapimide iyi hidrolize etmektedir. Ancak TEM ve SHV'den farklı olarak klavulanik asitle tazobaktam kadar iyi hidrolize olmaktadır¹⁷. TEM ve SHV enzimleriyle ilişkili olan diğer 2be subgrubuna dahil enzimler BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, PER ve VEB enzim aileleridir. Klinik laboratuvarlarda tespit amaçlıda kullanılabilecek bir karakteristik özellik olarak bu enzimlerin hepsi klavulanik asitle inhibe olabilmektedir.

Subgrup 2br enzimler subgrup 2be'dekilere ek olarak klavulanik aside direnç kazanmış geniş spektrumlu enzimlerdir. Günümüzde TEM-30, TEM-31 (IRT-1 ve IRT-2) gibi 135 TEM enziminden 36'sı ayrıca 72 SHV enziminden 5 tanesi (örneğin SHV-

10) bu grubun özelliklerini kazanmıştır. 2010 yılına kadar bu enzimlerin özelliklerini taşıyan CTX-M enzimi tanımlanmamıştır.

Subgrup 2ber enzimleri genişlemiş spektrumla değişken klavulanik asit direncinin kombine olduğu TEM enzimleridir. Bu enzimlerin neredeyse hepsinde TEM-1`de görülen klavulanik asit direncinden fazla direnç görülmesine rağmen klavulanik asit direnci bazen orta seviyelere düşebilmektedir. Bu enzimler “complex mutant TEM” teriminin kısaltması olarak CMT ismiyle de anılmaktadırlar (örneğin TEM-50: CMT-1)^{37, 38}.

Subgrup 2c penisilinazlar ise karbenisilin veya tikarsilini benzilpenisiline göre en az %60 daha hızlı hidrolize edebilme yeteneklerine göre fonksiyonel olarak karakterize edilmektedirler¹⁸. Genellikle bu penisilinazlar klavulanik asit ve tazobaktamla inaktive olurlar. Çünkü karbenisilin çok sık kullanılan bir antibiyotik değil ve geliştiriciler tarafından stabilitesi çalışılmamıştır. Geçtiğimiz dekatta sadece birkaç yeni 2c enzimi tanımlanmıştır^{26, 39, 40}.

Subgrup 2ce grubunda sadece yeni tanımlanmış olan sefepim ve sefpiroma karşı aktif olan genişlemiş spektrumlu karbenisilinaz RTG-4 (CARB-10) vardır⁴¹.

Subgrup 2d kloksasilin ve oksasilini benzilpenisilinlere oranla %50`den fazla hidrolize edebilme yeteneklerine göre sınıflandırılmışlardır. Bundan dolayı bu enzimler OXA kısaltmasıyla anılmaktadır. Karbenisilin hidroliz edebildikleri bir diğer antibiyotiktir. OXA enzimlerinin çoğu fonksiyonlarından ziyade içerdikleri aminoasit motiflerine göre sınıflandırılmıştır. Karakteristik özellik olarak bu gruptaki enzimlerin çoğu NaCl tarafından inhibe edilebilmektedirler. Günümüzde β -laktamaz ailesinin en büyük ikinci grubunu oluşturmaktadırlar.

Subgrup 2de genişlemiş spektrumla oksimin- β -laktamlara ek olarak kloksasilin ve oksasilin i hidrolize eden ancak karbapenemlere bir etkisi olmayan enzimleri içermektedir. 2de enzimlerinin çoğu OXA-10`dan 1-9 aminoasit eksilmesiyle türemişlerdir ve OXA-11, OXA-15 tipi enzimler bu gruba dahildirler. Bu enzimler genellikle Türkiye ve Fransada özellikle *P. aeruginosa* izolatlarında görülmektedirler⁴². Bu grup enzimlerde seftazidime karşı görülen direnç sefotaksim ve aztreonama karşı görülen dirence göre belirgin derecede daha üstündür. Ancak OXA-1 veya OXA-31 gibi sadece birkaç oksasilinaz sentezleyen izolatlar seftazidime duyarlı iken sefepime dirençli olabilmektedirler⁴³.

Yeni tanımlanan subgrup 2df enzimleri ise karbapenem hidrolize edebilme yeteneğine sahip OXA enzimleridir. Bunlar genellikle *A. baumannii* izolatlarında görülür ve genellikle kromozomda kodlanan genler tarafından sentezlenirler⁴⁴. Ancak *Enterobacteriaceae*`lerde görülen OXA-23 ve OXA-48 gibi enzimlerin genleri plazmidler üzerinde kodlanır^{18, 45}. 2df sub grubundaki enzimler aminoasit sıra benzerliklerine göre 9 kümeye ayrılmaktadır^{44, 46-48}. Kloksasilin ve oksasilini hidrolize edebilme yeteneklerine göre fonksiyonel olarak sınıflandırılırsalarda, 2df sub grubunda sadece birkaç enzim bu substratlarla test edilmiştir⁴⁴. Test edilenlerden ise sadece OXA-50`de oksasilin hidrolizi tespit edilememiştir. Karakterizasyonu yapılmış OXA karbapenemazlarının karbapenemlere karşı gösterdiği hidrolitik aktivite zayıftır ve imipenemi meropenemden daha iyi hidrolize edebilmeleriyle tanınırlar. Hidrolitik aktivite çalışmalarında benzilpenisilinler ve oksasilinlere karşı görülen hidrolitik aktivite karbapenemlerle karşılaştırıldığında 40 hatta 50 kat daha iyi bir hidrolizasyon olduğu belirlenmiştir^{17, 44}. Üretici mikroorganizmalar genellikle karbapenemlere dirençli görülsede, özellikle transformant yada transkonjugant *E. coli* izolatlarının karbapenemlere duyarlı olduğu görülmektedir⁴⁴. Klavulanik asit inhibisyonuna karşı bu enzimleri üreten mikroorganizmalar duyarsız kalmaktadır.

Subgrup 2e sefalosporinazlarının karakteristik özelliği genişlemiş spektrumlu sefaloprinleri hidrolize etmeleri ve tazobaktam veya klavulanik asitle inhibe olabilmeleridir. *Proteae*`deki indüklenebilir kromozomal sefalosporinazlarda genellikle bu gruptadırlar. Bu enzimler benzer mikroorganizmalarda görülebildiklerinden yada direnç patternleri değişken olabildiğinden grup 1 AmpC enzimleri yada GSBL`lerle sıklıkla karıştırılabilmektedir. AmpC enzimlerinden ayrımı için aztreonama karşı görülen zayıf afiniteden faydalanılabilir⁴⁹. Bu gruba dahil olan enzimlerin çoğu artık GSBL olarak tanımlandığı için 1995`ten beri gruba yeni bir üye dahil edilmemiş ve edilmeside beklenmemektedir¹⁷.

Subgrup 2f moleküler sınıf A`dan serin karbapenemazlarını içermektedir. Klavulanik aside göre tazobaktamla daha iyi inhibe edilebilen bu enzimlerin tipik substratı karbapenemlerdir¹⁷. Örneğin seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler SME ve IMI-1 enzimleri tarafından iyi hidrolize edilmezken, aztreonam çoğu tarafından (GES-3 ve GES-4 haricindekiler) degrade edilebilmektedir. SME ailesi yanında, IMI-1 ve NMC-1 β -laktamazları kromozomal subgrup 2f enzimlerinin temsilcileridirler⁴⁸.

Ancak daha endişe verici olanlar plazmid aracılı subgrup 2f enzimleri olan KPC ve bazı GES (eski IBC) enzimleridir. Özellikle KPC tipi karbapenemazlar New York, İsrail ve diğer pek çok dünya kentlerinde çoklu ilaç dirençli gram (-) hastane infeksiyonlarına ve salgınlara yol açmıştır⁵⁰⁻⁵⁶.

2.4.3. Grup 3 Metallo-B-Laktamazlar

Metallo β -laktamazlar (MBL), klinik izolatlarda genellikle bir veya iki diğer β -laktamaz enzimiyle birlikte sentezlenen, hem fonksiyonel hem de yapısal olarak çok özgün olan bir β -laktamaz ailesidir. Aktif bölgelerinde bir çinko (Zn) iyonuna ihtiyaç duymalarından dolayı yapısal olarak diğer β -laktamazlardan farklıdırlar. Fonksiyonel olarak ilk önceleri karbapenemleri hidrolize edebilme yeteneklerine göre ayrılmalarda daha sonraları bu yeteneğin diğer bazı serin β -laktamazlardada olduğu anlaşılmıştır. Ancak serin beta laktamazlarla karşılaştırıldığında MBL enzimlerinin monobaktamlara karşı hidrolitik aktivitesinin zayıf olduğu ayrıca klavulanik asit ve tazobaktamla inhibe olmadığı görülmektedir. Bunun yerine bu enzimler EDTA, dipikolinik asit yada 1,10-o-phenanthroline gibi metal iyon şelatörleriyle inhibe olmaktadır^{57, 58}. Bu metalloenzimler yapılarına göre alt sınıflara (altsınıf: B1, B2, B3) yada fonksiyonlarına göre alt gruplara (altgrup: 3a, 3b, 3c) ayrılmaktadır¹⁷. MBL enzimleri sayıları çok hızlı artmayan ayrıca gram (+)'lerde kromozomda kodlanan enzimlerdir ve bunun yanında *Bacterioides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi bazı gram (-)'lerde kromozomlarda kodlandığı bilinmektedir⁵⁹⁻⁶¹. MBL enzimleri transfer edilebilen, mobil elemanlar üzerinde görülmeye başladığında insanlar için daha karmaşık hale geldiler ve çeşitli konaklardaki evrimsel baskı sebebiyle birkaç düzineye varan bir çeşitliliğe ulaştılar¹⁷.

Daha ileri biyokimyasal sınıflandırma çalışmaları sonucu artan sayıdaki MBL enzimleri iki fonksiyonel sınıfa indirgenmiştir. Özellikle çoğu büyük plazmid-aracılı MBL ailesini içeren subgrup 3a'da genellikle non-fermentatiflerde bazende *Enterobacteriaceae*'lerde görülen IMP, VIM gibi önemli enzimler bulunmaktadır⁴⁸. Bu enzimler aktif bölgede bulunan iki çinko atomuna ligand görevi gören ve geniş spektrumdan sorumlu olan konsensus aminoasit dizilerini içerdiğinden moleküler sınıf B1'de yer alırlar^{22, 62, 63}. Ek olarak *S. maltophilia*'daki L1 MBL enzimi ve CAU-1, GOB-1, FEZ-1 gibi alt sınıf B3 MBL enzimleri subgrup 3a'ya eklenmiştir¹⁷. Bu

enzimler diğ er subgrup 3a enzimlerinden çinko bağlanma bölgesini kodlayan aminoasit dizilerindeki farklılıklarına göre ayrılmalarına rağmen hem diğ er yapısal özellikleri hemde substrat profillerindeki benzerlikleri sebebiyle bu sınıfta yer bulmuřlardır¹⁷.

Subgrup 3b penisilin ve sefalosporinlere kıyasla daha çok karbapenemleri hidrolize eden daha küçük bir MBL enzim ailesidir⁶⁴. Moleküler çalışmalarda  -laktamaz aktivitesi araştırılırken, nitrosefin gibi kromojenik sefalosporinler kullanılırsa bu enzimlerin tespit edilmesi zorlaşmaktadır. Bunun için *Aeromonas* spp. tarafından üretilen kromozomal MBL enzimleri nitrosefin ile tarama yapılan klinik laboratuvarlarda gözden ka abilmektedir⁶⁵. Mekanik olarak, bu MBL enzimleri aktif bölgelerinde tek çinko iyonu bulunduğu durumlarda, iki iyon bulunduğu duruma göre karbapenemlere karşı daha aktif bir hidrolitik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir^{66, 67}.

1995`te grup 4`te yer alan  -laktamaz enzimlerine, George Jacoby ve Karen Bush`un 2010`da önerdikleri sınıflandırma şemasında yer verilmemiş, buna sebep olarakta bu enzim grubunun karakterizasyon çalışmalarının henüz yetersiz olması g sterilmiřtir¹⁷.

Tablo 2. B-laktamaz grubdan ve genel özellikleri³¹⁻³⁹.

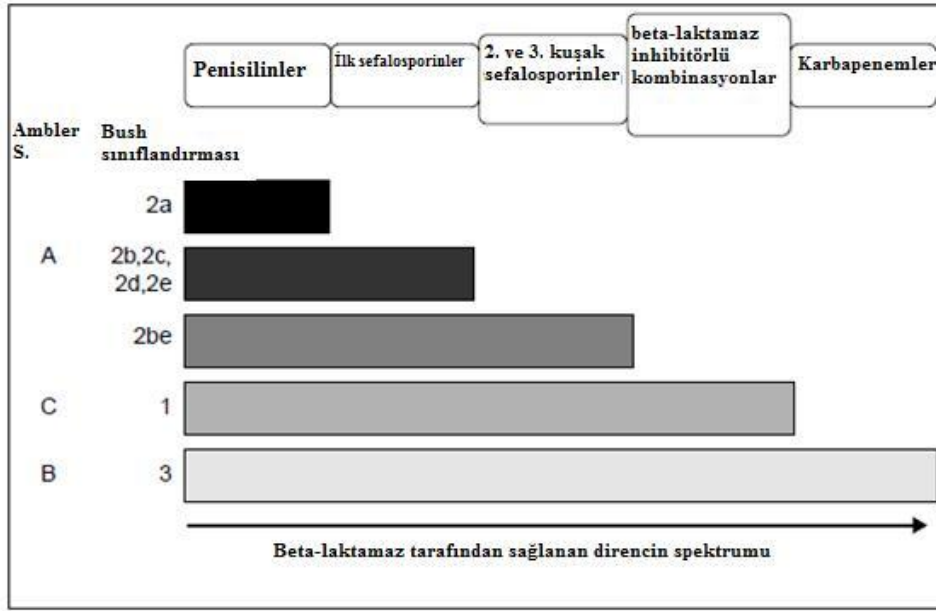
B-laktamaz	1	2a	2b	2be	2br	2c	2d	2e	2f	3	4
Molekül sınıfı	C	A	A	A	A	A	D	A	A	B	Belirsiz
Tercih edilen substrat	Sefalosporinler	Penisilinler	Penisilinler; Sefalosporinler	Penisilinler, Dar ve Geniş Spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar	Penisilinler	Penisilinler, Karbamsilin	Penisilinler, Kloksasilin	Sefalosporinler	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	Birçok β -laktam, Karbapenemler dahil	Penisilinler
Örnek enzimler	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri, MIR-1	Gram pozitif bakterilerin penisilnazdan	TEM-1, TEM-2, SHV-1	TEM-3 ile TEM-26, SHV-2 ile SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1	TEM-30 ile TEM-36, TRC-1	PSE-1, PSE-3 ve PSE-4	OXA-1 ile OXA-11, PSE-2 (OXA-10)	<i>Proteus vulgaris</i> in indüklenebilir sefalosporinazdan	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A'sı, <i>Serratia mercens</i> 'in SME-1'i	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın L1'i, <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CcrA'sı	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın penisilnazı
I	+	++++	++++	++++	++	++++	Değişken	++++	++++	+	+
N	++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	+	+
H	++	++++	++	++++	+	++++	Değişken	++++	++	+	+
Enzimlerin klinik önemi	3. kuşak sefalosporinlere yaygın direnç		Klinik izolatlarda en sık karşılaşılan β -laktamaz	3. ve 4. Kuşak sefalosporinlere dirençten sorumlu	Mevcut β -laktamaz inhibitörlerine olan duyarlılığı az		3. kuşak sefalosporinlere yaygın direnç		Belirli karbapenemlere direnç	Klinikte kullanılan çoğu β -laktam ajanına karşı direnç	

2.4.4. B-laktamaz Enzimlerinin Tarihçesi ve Evrimi

β -laktamaz enzimlerinin varlığı ilk olarak 1929 yılında Fleming tarafından bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığına gözlemlenmesi ile speküle edilmiştir. Ancak gerçek anlamda β -laktamazlar penisilinin yoğun olarak kullanıldığı Boston'dan (1940) bildirilmiştir. Abraham ve Chain (1940) *E. coli*'den elde ettikleri inhibitör enzime "penisilinaz" adını vermişlerdir. Plazmid kökenli penisilinazların yaygınlaşması ve penisilin kullanımının artmasına bağlı olarak penisilinaz enzimi *Staphylococcus aureus*'ta da görülmüş ve diğer stafilokok türleri arasında hızla yayılmıştır⁶⁸.

Birçok gram negatif bakterinin kromozom aracılı β -laktamaz ürettiği gösterilmiştir. Bu enzimlerin bazı PBP'ler ile benzer DNA dizilerine sahip olmaları bu enzimlerin PBP'den köken alabileceğini düşündürmüştür. Gram negatif bakterilerdeki ilk plazmid aracılı β -laktamaz olan TEM-1, 1960'lı yılların başında tanımlanmıştır. Bu enzim Yunanistan'da Temoniera adlı bir hastanın kan kültüründen izole edilen *E. coli*'de bulunmuştur. Plazmid ve transpozon aracılı olması bu enzimin diğer bakteri türlerine yayılımını kolaylaştırmıştır ve bu enzimin bulunuşundan itibaren on yıl içinde pek çok *Enterobacteriaceae* üyesinde dünya genelinde yayılım göstermiştir. TEM-1 benzeri bir enzim olan TEM-2 enzimi 1969 yılında *Pseudomonas aeruginosa*'da saptanmıştır. Günümüzde bu enzimler *Enterobacteriaceae* ailesinin pek çok üyesinde, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerinde bulunmaktadır. Diğer bir plazmid aracılı enzim olan SHV-1 enzimi 1979 yılında *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinde bulunmuştur. Bu enzimin *K. pneumoniae* izolatlarında kromozom aracılı ve *E. coli* izolatlarında plazmid aracılı olduğu gözlenmiştir⁶⁸.

20 yılı aşkın süredir β -laktamazların hidrolitik etkilerine dirençli pek çok antibiyotik geliştirilmiştir. Ancak bu antibiyotiklerin yaygın biçimde kullanımı mutasyona uğramış β -laktamaz enzimine sahip dirençli bakterilerin oluşmasına neden olmuştur⁶⁸. B-laktamazların ilk mutasyona uğramış formu olan SHV-2, Almanya'da 1983 yılında *Klebsiella pneumoniae* izolatında bulunmuştur⁶⁹. G.S.B.L. enzimlerinin büyük çoğunluğu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden köken alan mutant enzimlerdir⁷⁰.



Şekil 5. Bazı klinik açıdan önemli β -laktamazın sağladığı direncin zaman içinde gelişen spektrumu.

2.4.5. B-laktamaz Enzimlerinin İsimlendirilmesi

β -laktamazların isimlendirilmesinde birden fazla yöntem ve/veya faktör kullanılmaktadır. Bazı enzimler, hedef substratlarına göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları içerdikleri genlere (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), ve nihayet bazıları da keşfeden kişilere göre (HMS) isimlendirilmiştir^{71,72}. Ancak, bu isimlendirmelerden bazıları, günümüzde geçerliliklerini yitirmişlerdir. Örneğin; SHV, sülfidril variabl'dan kısaltılmış bir isme sahipken, günümüzde SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu açığa çıkmıştır. Benzer şekilde, ilk kez Pseudomonas'tan izole edilmiş olan PSE enziminin, artık enterobacter'lerde de bulunduğu bilinmektedir⁷³. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma, Ambler ve Bush-Jacoby-Mederios'un sınıflandırmalarıdır⁷³.

2.5. Karbapenem Grubu Antibiyotikler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve thienammycin adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. B-laktam grubu antibiyotiklerin en geniş spektrumlu ailesidir. Diğer β -laktamlardan ayıran özellikleri Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesidir. Etki mekanizmaları peptidoglikan biyosentezinin durdurulmasına yöneliktir. Etki ettikleri spektruma Mikobakteriler, mikoplazmalar, nadir non-fermentatifler ve *Aeromonas* dışındaki Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob mikroorganizmalar dahildir. Özellikle GSBL etkinliği olan veya AmpC enzimi sentezleyebilen gram negatif bakterilere karşı etkinliğini koruması en büyük avantajlarıdır⁴⁷. İlk bulunan karbapenem ajanı imipenem, ikinci olarak kullanıma sunulan ise meropenemdir (1996). Meropenem imipenemin karbapenem halkasına 1- β -metil grubu eklenmesiyle elde edilmiştir. Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez⁴⁸.

2.5.1. İmipenem

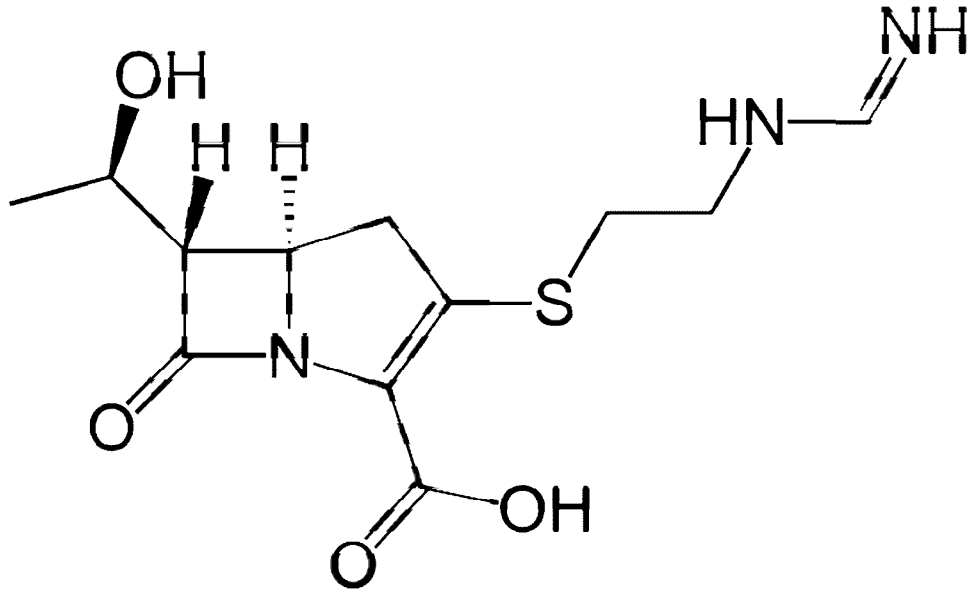
Etkin olduğu spektrum çok geniştir. Çoğu bakteri için etki spektrumu 4mg/L'nin altındadır. Farklı antibiyotik kombinasyonlarıyla kıyaslandığında, çeşitli ciddi enfeksiyonların tedavisinde son derece etkin bir monoterapotik ajandır. Özellikle invivoda klinik olarak önemli olan çoğu Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakteriye etkilidir.

Yapısal olarak bir β -laktam halkası içermekle birlikte diğer β -laktam antibiyotiklerden farklı olarak sis konfigürasyonundaki açıl amino yan zincirinin yerine trans konfigürasyonunda hidroksietil yan zinciri eklenmiştir. Trans konformasyonu imipenemin β -laktamaz dayanıklılığını sağlar. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak a-halkasında sülfür atomunda metilen yapısı içerir. Bu yapı karbapenemlerin bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırır. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre membranından girişini kolaylaştırır. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkinliği artırır⁵⁰.

İmipenem bu olağanüstü geniş etki spektrumuna ve β -laktamaz direncine karşın, böbrekte ileri derecede enzimatik yıkıma uğrar. Metaboliti nefrotoksik bir ajandır ve busebepten dolayı tek başına kullanılamaz. İmipenem etkisini antagoniste etmez. Ticari

olarak dehidropeptidaz (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1/1 oranında birleştirilerek kullanılmaktadır. Silastatin sodyum, DHP-1'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür. Silastatinin antibakteriyel etkinliği yada β -laktamazlar üzerine etkinliği yoktur^{51,52}.

İmipenem'in etki mekanizmasına bakıldığında diğer β -laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvar sentezini bloke ederek etki ederler ve bakterisidalırlar. İmipenem, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yüksek moleköl ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlerine (PBP) yüksek bir afinite ile bağlanır. Bağlanma ilk önce PBP 2'ye ve arkasından PBP-1a'ya olur. PBP-2'ye bağlanması Gram negatif basillerin sferoblastlara dönüşmesine neden olur. Ek olarak PBP-1'e bağlanması Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde hücrelerin daha hızlı lizisine yol açar. *E. coli*'de PBP-1a, 1b, 2, 4, 5 ve 6'ya; *P. aeruginosa*'da PBP-1a, 1b, 2, 4, 5'e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder^{53,54}. Gram negatif bakterilerde dış membran penetrasyonunda daha fazladır⁵⁵. Düşük moleköl ağırlığı ve zwitterionik (nötral yük) nedeniyle bakterinin hücre duvarına, penisilin ve sefaloporinlerden daha hızlı penetre olur⁵⁶.

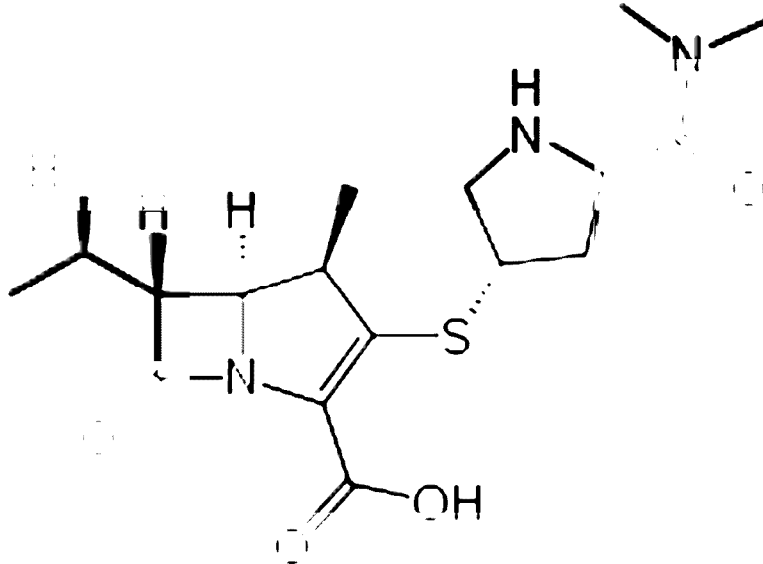


Şekil 6. İmipenem'in kimyasal yapısı.

2.5.2. Meropenem

İmipenem`in 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. PBP-2, hem imipenemin hem de meropenemin başlıca hedefidir. Ancak meropenem. *P. aeruginosa* ve *E. coli*`nin PBP-2 ve 3`üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve gram negatif bakterilerdeki karbapenemazlar hariç diğer tüm β -laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden imipenem, gram pozitif organizmalara karşı daha etkili gözükürken meropenem, gram negatiflere özellikle *P. aeruginosa*`ya karşı etkilidir^{57, 58}.

Meropenem genel olarak 3. Kuşak sefalosporinlerden daha güçlü bir indükleyici olmasına karşın, Enterobacter ve *P. aeruginosa* izolatlarındaki grup 1 β -laktamazlar üzerindeki indükleyici etkisi imipeneme göre daha zayıftır^{59,60}. Meropenem`in *P. aeruginosa*`daki PBP-2 ve PBP-3`e karşı yüksek afinitesi olmasına karşın imipenemin afinitesi sadece PBP-2`ye karşıdır. Bu durumun, özellikle meropenemin *P. aeruginosa* üzerinde daha güçlü bir etki gösterebilmesinde katkısının olabileceği ifade edilmektedir^{61, 62}. Meropenem için asıl hedef *P. aeruginosa*`daki PBP-3`tür⁶³.



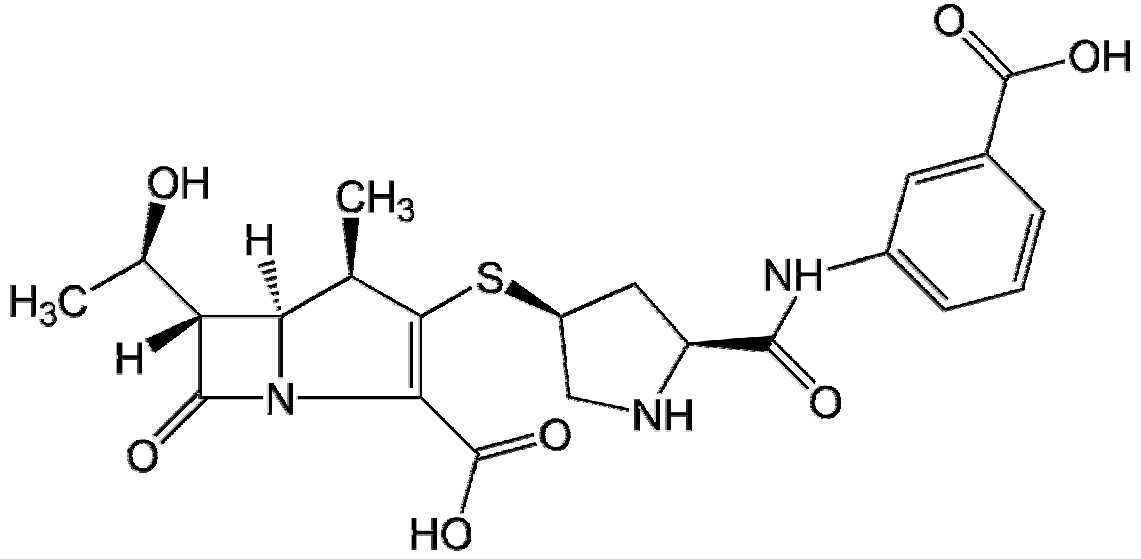
Şekil 7. Meropenem`in kimyasal yapısı.

2.5.3. Ertapenem

Türkiye`de klinik kullanımda iki karbapenem (imipenem/silastatin ve meropenem) mevcuttur. İmipenem böbrekte bulunan dihidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimine dayanıksızdır, bu nedenle DHP-1 inhibitörü olan silastatin ile birleştirilmiştir. Ertapenemin yapısında bulunan 1- β -metil grubu renal DHP-1 enzimine karşı dayanıklılığı sağlar. İmipenem ve meropeneme benzer şekilde 6-hidroksietil grubu β -laktamazlara karşı stabiliteyi sağlar. İmipenemden farklı olarak C-4 pozisyonunda metil grubu içerir, benzoat anyonik yan zinciri ise proteine bağlanmada artış ve serum yarı ömründe uzamaya neden olur⁶⁴.

Ertapenem β -laktam antibiyotikler gibi hücre duvar sentezini engelleyerek bakterisidal etki gösterir. Erpenem aerobik gram pozitif mikroorganizmalardan *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* (penisilin duyarlı), *S. pyogenes*`e etkiidir. Aerobik gram negatif mikroorganizmalardan *E. coli* , *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Samonella* spp., *Shigella* spp., *H. İnfluenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* ertapeneme duyarlıdır^{65, 66}. Anaerop mikroorganizmalardan *B. fragilis*, *Bacterioides* spp., *Clostridium clostridioforme*, *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus* türleri, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella bivia*`ya etkilidir<sup>67,68</sup>. Ertapenem *Stenotrophomonas maltophilia*, MRSA ve *Enterococcus* spp.`de etkisizdir⁶⁹. *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. meropeneme ve imipeneme göre ertapeneme daha az duyarlıdır⁷⁰.

Ertapenem penisilinaz, sefalosporinaz, ampC ve GSBL`lerden etkilenmez ancak diğer karbapenemler gibi metallo- β -laktamazlara dayanıksızdır. Ertapenem proteinlere özellikle albümine yüksek oranda bağlanır (%85-95). Bu proteine bağlanma oranı ertapenemin plazma konsantrasyonu ile ilişkilidir. Ertapenem konsantrasyonu <100mg/L iken proteine bağlanma %95, 300mg/L iken ise %85`tir. 1mg IM uygulama sonrası 2-3 saatte tepe düzeyine ulaşır<sup>64, 65</sup>. Ertapenem başlıca böbrekler aracılığı ile atılır ve plazma yarı ömrü 4 saattir<sup>69</sup>. Hemodializ ile ertapenemin %30`u uzaklaştırılır. Hepatik metabolizması yoktur. 1g IV uygulama sonrası %10`u dışkı ile atılır⁷⁰.



Şekil 8. Ertapenem'in kimyasal yapısı.

2.6. Karbapenemazlar

Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojinin son dekatlardaki en büyük problemi mikroorganizmaların hızla gelişen antibiyotik pazarına rağmen gösterdiği rekabet gücüdür. Mikroorganizmaların artık insanoğlundan önde olduğu bu rekabette antibiyotik direnç mekanizmalarının anlaşılması ve çare üretilmesi mikrobiyoloji ve farmakoloji gibi bilim dallarının temel uğraşları haline gelmiştir. Geçmiş yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında tür düzeyinde tanı yeterli olurken günümüzde Gram pozitif bakterilerde MRSA (Metisilin Resistant *S. aureus*), VRSA (Vankomisin Resistant *S. aureus*), VRE (Vankomisin Resistant Enterokok), Mikobakterilerde MDR-MT (Multi Drug Resistant *M. tuberculosis*), XDR-MT (Extremely drug resistant *M. tuberculosis*) veya gram negatif bakterilerde G.S.B.L. (Genişlemiş Spektrumlu B-Laktamaz) veya Karbapenemaz üretimi tanıda istenilen yeni kavramlardır⁹⁸.

Gram negatif, basil şeklindeki Enterobakteriler, barsak normal flora elemanlarından ve insanda en sık karşılaşılan patojen bakterilerdendir. Hem toplumda hemde hastane içinde sebep oldukları ciddi enfeksiyonlar ve gerek klonal gerekse mobil elementler yoluyla direnci kolay yayabilme potansiyelleri sebebiyle tehlike arz ederler⁹⁹. Bu sebeple Enterobakteri enfeksiyonlarında Karbapenem gibi G.S.B.L enzimlerine dirençli antibiyotikler son seçenek olarak kullanılan antibiyotiklerdir¹⁰⁰. Ancak günümüzde bakteriler sentezledikleri karbapenemaz enzimleri sayesinde

karbapenemlere direnç kazanmış ve bu durum ciddi Enterobakteri infeksiyonlarında tedavi güçlükleri yaşanmasına yol açmaktadır.

K. Bush ve G. Jacoby 2010 yılında β -laktamazların sınıflandırmasını güncellediği çalışmasında karbapenemaz enzimlerini (i) Moleküler sınıf A [Ambler sınıf A] (ii) Moleküler sınıf B ve (iii) Moleküler sınıf D olmak üzere 3 ana gruba dağıtmıştır¹⁷(Tablo 3).

Tablo 3. *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenemaz enzimleri, β -laktam antibiyotiklerine karşı görülen hidroliz sektrumları ve inhibitör ajanlar. (+) işaretlerinin sayısı enzimin tek başına gösterdiği hidrolizin derecesini belirtir. Bakteriye konanın antibiyotiğe gösterdiği direnç olarak algılanmamalıdır. (-) işareti ise tespit edilebilir hidrolizin olmadığını gösterir⁹⁹.

Ambler Sınıfı	Enzim ismi	Lokalizasyon	Hidroliz Spektrumu						İnhibitör
			Penisilinler	1. kuşak Sefalosporinler	2. kuşak Sefalosporinler	3. kuşak Sefalosporinler	Aztreonam	Karbapenemler	
A	SME 1-3	Kromozom	++	++	-	+	+	+	Klavulanat, Tazobaktam, Sulbaktam, NXL- 104
	NMC-A	Kromozom	++	++	-	+	-	++	
	IMI- 2	Plazmid	++	++	-	+	-	++	
	GES 4,5,6	Plazmid	++	++		+	-	+	
	KPC 2-12	Plazmid	++	++	+	++	+	++	
B	IMP 1-33	Plazmid	++	++	-	++	-	++	EDTA
	VIM 1-33	Plazmid	++	++	++	++	-	++	
	NDM 1-6	Plazmid	++	++	++	++	-	+	
	KHM-1	Plazmid	++	++	++	++	-	++	
D	OXA-48	Plazmid	++	++	+/-	+/-	-	+	NaCL
	OXA-181	Plazmid	++	++	+/-	+/-	-	+	

2.6.1. A grubu Karbapenemazlar

Karbapenem aktivitesi en düşük olan ve son yıllara kadar daha az sıklıkta izole edilen bu enzimler β -laktamların çoğunu iyi hidrolize eder ve karakteristik olarak tazobaktam ve klavulanik asit`le in-vitro ortamda inhibe olurlar<sup>99</sup>. Enterobakterilerden izole edilen en önemli türleri IMI, SME, SFC, GES ve KPC`dir.

IMI enzim ailesi IMI-1 ve IMI-2 olmak üzere 2 üyeden oluşur, Nmc-A enzimiyle birlikte genellikle Enterobakter suşlarında bulunur. IMI-1 ilk kez Rasmussen ve ark.¹⁰¹ tarafından 1996`da bir Enterobacter cloaceae izolatında, IMI-2 ise Enterobacter asburiae izolatında Aubron ve ark.¹⁰² tarafından 2005 yılında tanımlanmıştır. Bu iki çalışma dışında bu enzimler hakkında klinik olarak önemli bilgi çok azdır.

SME enzimleri ise adını Serratia marcescens bakterisinden alır. SME-1, SME-2 ve SME-3 olmak üzere 3 tiptir. Kromozomal kökenli olan bu enzimler ilk olarak Naas ve ark. tarafından London Hospital`de izole edilen bir klinik S.marcescens S6 suşunda gösterilmiştir¹⁰³. Bu enzim ailesi genellikle Amerika kıtasındaki ülkelerde problem yaratan ve buralarda rutin karbapenem tarama testlerine katılması önerilen bir gruptur¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

GES grubu enzimlerden GES-1 karbapenemaz aktivitesi olmayan ve daha çok GSBL sınıfında yer alan bir enzimdir ancak bu grubun geri kalan üyelerinde zayıfta olsa karbapenemaz aktivitesi gözlenmektedir⁹⁹. Avrupa, Orta Doğu, Güney Afrika ve Asyadan rapor edilmiş olan bu enzimlerden GES-3 ve GES-4 aztreonama gösterdikleri dirençle diğerlerinden ayrılır¹⁰⁸.

KPC enzimleri ise A grubu serin karbapenemazların en yaygın ve en önemli ailesidir. Özellikle Amerika ve İsrail`de bu enzimler pek çok çalışmada gösterilmiş ve plazmitlerle taşındığı tartışılmıştır¹⁰⁹⁻¹¹² ancak Cuzon ve ark.¹¹³. *K. pneumoniae* ST258 suşunun tüm dünyadaki yaygınlığına dikkat çekmiş, bu klonun KPC genlerinin yüksek insidansına katkıda bulunmuş olabileceğini belirtmiştir. KPC genlerinin mobilizasyon özelliklerinin irdelendiği bir başka çalışmada ise Cuzon ve ark. diğer *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*`larda da görülebilen Tn4401 transpozonunun KPC genlerinin taşınımında rol aldığını bildirmiştir<sup>114</sup>. İlk izolasyonu ve tanımlaması 1996`da Kuzey Carolina`da yapılan bu enzimler¹¹⁵ günümüzde 12 tiple temsil edilmektedir(KPC 1-12)(www.lahey.org). Özellikle hastanelerde oluşturdukları

infeksiyonlar çoklu ilaç dirençli olmaları bakımından bu suşları tedaviyi zor ve limitli kılmaktadır. Son dekatta tüm dünyada salgınlar oluşturan bu enzimler özellikle ismini aldıkları *K. pneumoniae* suşlarından (tüm *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunabilir) %50 veya daha fazla mortalite oranları ile bildirilmektedir¹¹⁶⁻¹²⁰.

2.6.2. B Grubu Karbapenemazlar (Metallo B-Laktamazlar-MBL'ler)

Klinik açıdan en problemli enzim grubudur. Aktif kısımlarında bir metal (çoğunlukla Zn^{+2}) iyonu bulundurdıklarından etki spektrumları geniştir ve tüm β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler¹⁷. İçerdikleri metal iyonu sayesinde bu enzimler karakteristik olarak ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA), dipikolinik asit gibi metal şelatörü olan ajanlarla inhibe edilebilirler ve bu özellikleri in-vitro identifikasyonda kullanılabilir. Bu enzimleri sentezleyen suşlarda görülen bir başka karakteristik özellikte metallo- β -laktamazların genellikle bir veya iki başka β -laktamaz enzimiyle (sefalosporinaz veya serin- β -laktamaz enzimleri) birlikte sentezleniyor olabileceğidir¹⁷. Tüm dünyada yaygın olan ve klinikte problem yaratan B grubu karbapenemazlar arasında IMP, VIM ve NDM sayılabilir.

Metallo β -laktamazların yayılımına dair yapılan pek çok araştırma yapılmıştır. Bu enzimlerin ilk önce kromozomal olarak çeşitli çevresel ve patojen *B. cereus*, *Aeromonas* spp. ve *S. maltophilia* türlerinde tespit edildi¹²¹⁻¹²⁴. 90'lı yıllarda ise mobil olarak taşındığı ve pek çok *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi türler tarafından sentezlendiği rapor edilmiştir¹²⁴⁻¹²⁶. Asıl korkutucu olan durumda bu çalışmalarda rapor edilen genetik transfer varyantlarının çeşitliliği (çeşitli traspozonlar, insersiyon segmentleri, integronlar ve plazmitler) ve bu yapıların prevelansın artmasına yaptıkları katkıdır. Günümüzde bu enzimler klinikte her alanda görülebilecek, tedavilerde sürekli göz önünde bulundurulması gereken bir tehdit halini almıştır.

IMP enzimleri ilk olarak 1995'te bir *S.marcescens* izolatında tespit edildikten sonra *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae*'lerden izole edilmiştir¹²⁷⁻¹²⁹. Coğrafi olarak Japonya, Çin, Avustralya, Güney Kore ve Tayvan kuşağında daha sık izole edilirler. Bu belirli bölgeler dışında sınırlı sayıda olgu ile Türkiye, Brezilya, Lübnan ve Amerika gibi ülkelerdende IMP enzimleri bildirilmiştir¹³¹⁻¹³⁴. IMP enzimleri Class 1 integronlarla ilişki içindedir ve çoğunlukla gen kaseti içerisinde diğer başka antibiyotik direnç genleri (Aminoglikozid direnç genleri: aacA4,

aadA1, aadB; kloroamfenikole direnç geni: catB; diğer β -laktamaz genleri: OXA vb.) içerebilmektedirler⁹⁹.

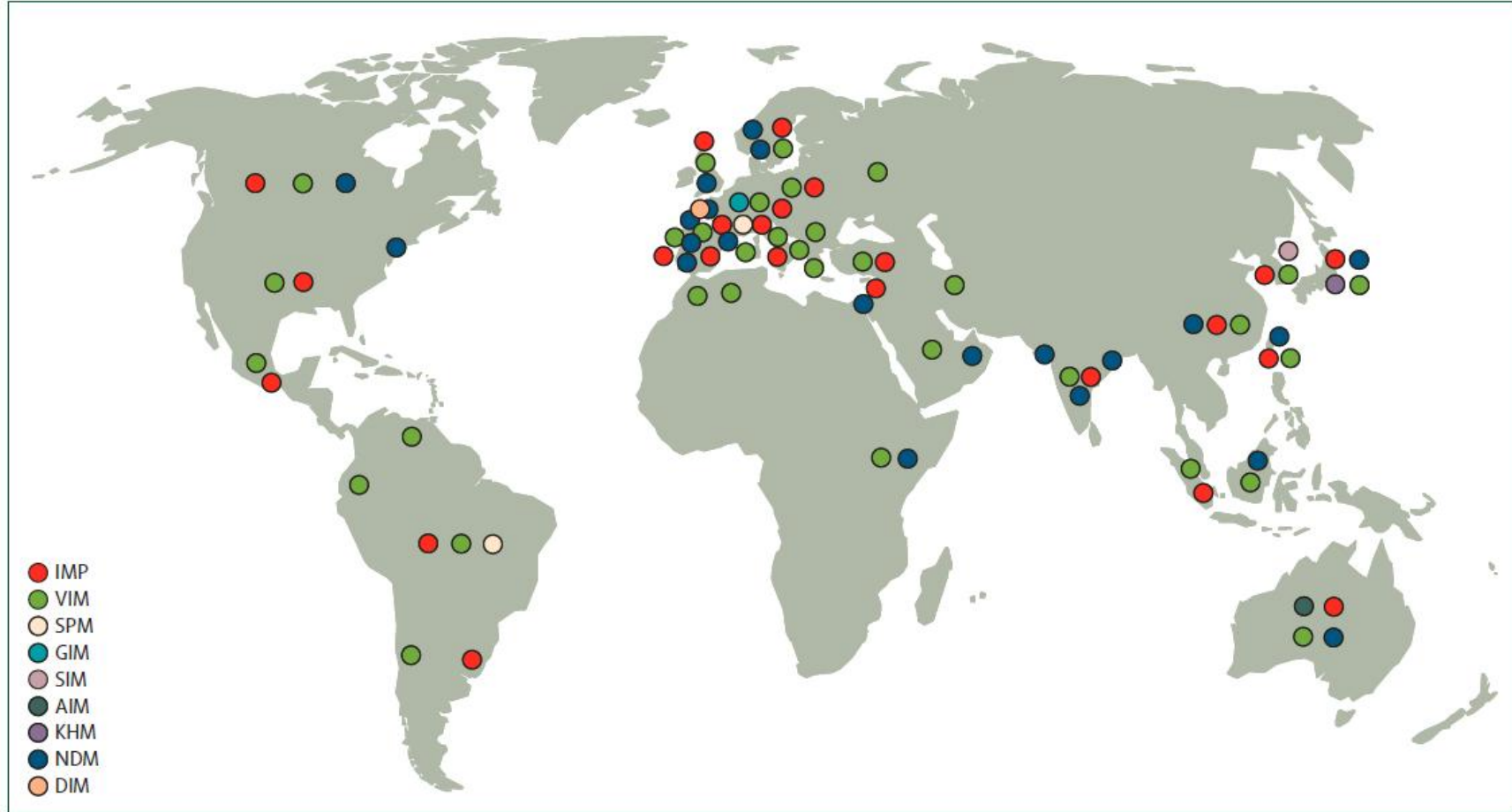
Bir diğer metallo- β -laktamaz enzim ailesi VIM enzimleridir. Bunlar ilk kez 1999'da İtalya'da izole edildiklerinden Verona B-Laktamaz ismini almışlardır. Nitekim 1 yıl sonra Fransa'da bir *P. aeruginosa* suşundan VIM-2 varyantı izole edilmiştir. ABD, Kuzey Avrupa, Tunus, Güney Kore, Venuzuella gibi dünyanın çeşitli yerlerinde VIM enzimlerinin bildirildiği çalışmalar yapılmıştır¹³⁵⁻¹³⁸. Ancak özellikle Akdenizde bu enzimler yaygınlık gösterebilmiş, Yunanistanda epidemi düzeyine ulaşmıştır^{135,139}. VIM tipi enzimlerin yayılımı çeşitli genetik yapılarla ilişkilidir. Çoğunlukla integronların içine yerleşen genler transpozon yada plazmidlerle ilişki kurabildiğinde türler arası transferler söz konusu olabilmektedir.

Metallo β -laktamazlar arasında günümüzde dünyanın en çok ilgisini çeken grup bu enzimlerden en son keşfedilen olan NDM (New Delhi B-Laktamaz) enzimleridir (Şekil 9). NDM enzimleri ismini İsveç'te daha önce Hindistan'ın New Delhi kentinde hospitalize olmuş bir hastadan 1998 yılında keşfedildiği için alır¹⁴⁰. Özellikle Hindistan, Pakistan ve bu ülkelerden yoğun göç alan İngiltere gibi ülkelerden sıklıkla bildiriler yayınlanmaktadır¹⁴¹. Bunun yanında özellikle son yıllarda tüm dünyadan NDM sentezleyen suşlar tanımlanmıştır¹⁴².



Şekil 9. NDM-1 sentezleyen izolatlar tüm dünyadaki popüler medya tarafından “Süper Mikrop” olarak adlandırılmış ve tehlike hakkında halkın dikkatini çekmeye çalışmıştır.

NDM-1 plazmidi bakteriler arasında doğal olarak taşınabilen ve karbapenemler dahil tüm antibiyotiklere direnç kazandıran ancak sadece tigesiklin, fosfomisin ve kolistine sınırlı duyarlılık özelliği olan bir plazmidtir¹⁰⁰. NDM-1 üreten izolatlar sıklıkla *K. pneumoniae* izolatlarında saptanmasına rağmen özellikle toplum kökenli *E. coli* izolatlarında son yıllarda sıklıkla tespit edilmektedir ayrıca en sık izole edildiği enfeksiyonlar idrar yolu enfeksiyonlarıdır^{99,100}. Bu geni taşıyan izolatların özellikle toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilmiş olması suşların kaynağını çevrede arayan çalışmaların sayısını artırmıştır. Örneğin Walsh ve ark. New Delhi'deki çevresel su kaynaklarında yaptıkları araştırmalarda pek çok ilişkisiz gram negatif izolatta NDM-1 sentezleyebilen suşlar izole etmiş ve bu suşların yayılımına ışık tutmuşlardır¹⁴³.



Şekil 10. Metallo β -laktamazların tüm dünyadaki yayılımını gösteren şema¹⁴⁴.

2.6.3. D grubu Karbapenemazlar

D grubu karbapenemazlar Bush ve Jacoby'nin 2010 yılında yaptıkları sınıflandırmada 2df grbunda yer alan ve karbapenemaz aktivitesi bulunan OXA (okzasilinaz) enzimleri olarak tanımlanmıştır¹⁷. Bu aileye mensup en önemli enzimler: OXA-23, 24, 27, 25, 26, 40, 48, 51, 58, 66, 69 ve 143'tür. Bu enzimlerin inhibitörü NaCl molekülüdür. Genellikle kromozomda kodlanan ve *A. baumannii* izolatlarında görülen bu genlerden OXA-23 ve OXA-48'in plazmidlerle taşınabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur^{18,44,45}. OXA-48'ler ilk olarak ülkemizden izole edilen bir suşta Poirel ve ark. tarafından tanımlanmıştır¹⁴⁴. Karbapenem aktivitesi karbapenemaz demeye yetecek ilk enzim ise İskoçya'da 1993'te Paton ve ark. tarafından izole edilen OXA-23 enzimidir¹⁴⁵.

D grubu karbapenemazların bakterilere sağladığı direnç profiline bakıldığında bunlar genellikle penislinleri iyi inaktive eden, 1. Kuşak sefalosporinleri, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarını hidrolize edebilen ancak sefepim, sefpirom gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı zayıf kalan enzimlerdir¹⁰⁸.

Bu grubun en önemli enzimi OXA-48 ve varyantlarıdır. İlk izole edildiği zamanlarda yayılımı ülkemizle sınırlı kalacağı düşünülen bu enzim artık tüm dünyadan sıklıkla bildirilmektedir. OXA-162, 163, 181, 204 ve 232 tanımlanan OXA-48 varyantlarıdır. Avrupa'daki yayılımdan tek başına 62kb'lık bir konjugatif plazmit olan IncL/M plazmidi sorumludur¹⁴⁶. Ancak yayılımın çoğundan bu plazmit sorumlu olmasına rağmen OXA-48 sentezleyen *K. pneumoniae* ST395 suşunun Fas, Fransa ve Hollanda'da tanımlanması klonal yayılımında etken olduğunu düşündürmektedir^{146,147}.

2.7. Türkiye özelinde Karbapenemaz Epidemiyolojisi

Karbapenemazların tüm dünyada epidemi boyutlara varan yayılımı düşünüldüğünde bu enzimleri sentezleyen bakterilerin Türkiye’de var olmadığını düşünmek hayalcilik olurdu. Ülkemizde yapılan çalışma sayısı gelişmiş ülkelerle kıyaslandığında çok az sayıda kalmasına rağmen gerek ülkemizde yapılan limitli analizler gerekse yurtdışındaki merkezlerle yapılan ortak çalışmalar bu enzimlerin ülkemizde ciddi boyutlarda yaygın olduğunu ortaya koymuştur.

Ülkemizin karbapenemlere dirençli izolatlarla ilk tanışması 2001 yılında İstanbul Çapa Hastanesinde izole edilen *K. pneumoniae* 11978 suşu ile idi¹⁴⁸. Bu izolat tüm dünyada rapor edilen karbapeneme dirençli okzasilinaz sentezleyen ikinci *Enterobacteriaceae* suşuydu. 2003 yılında ise Elazığ’dan rapor edilen bir yenidoğan olgusunda karbapenem üreten *P. aeruginosa* bildirilmiştir¹⁴⁹. Bu çalışmalarla yakın zamanlı olarak Toraman ve ark. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo β -laktamaz sıklığını fenotipik yöntemlerle araştırdıkları çalışmalarında, *Pseudomonas* suşlarının %24’ünün, *Acinetobacter* suşlarının ise %21’inin metallo β -laktamaz enzimi sentezlediğini rapor etmişlerdir¹⁵⁰.

Bu bildirilerden sonra ülkemizdeki araştırmacılar karbapenemaz enzimlerinin karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmış ve günümüze kadar pek çok enzim tiplendirilerek rapor edilmiştir. Toraman ve ark.’nın fenotipik çalışmasından sonra Bahar ve ark. ülkemizde ilk kez kardiyovasküler operasyon geçirmiş 53 yaşındaki bir hastanın solunum yolundan VIM-5 tipi metallo β -laktamaz üreten *P. aeruginosa* suşunu tiplendirmişlerdir¹⁵¹. Bundan bir yıl sonra adanada bir hastanede 2002’den önceki stoklanan suşlarda VIM-5 enzimi belirlenmiş enzimin genetik haritası çıkarılmıştır¹⁵². Bu çalışma aslında karbapenemaz enzimlerinin 2000’li yıllardan öncede ülkemizde varolduğunu ancak yetersiz araştırmalar nedeniyle tespit edilemediğini gösteren bir veri olarak kabul edilebilir. Bu bağlamda yüksek mortalite ve morbidite rakamlarıyla seyreden karbapenem dirençli gram negatif bakteri infeksiyonlarının kontrol edilebilmesi için araştırma çalışmalarının öneminin anlaşılması gerekmektedir.

Bir diğer metallo β -laktamaz enzimi olan IMP ise ülkemizde ilk olarak Aktas ve ark. tarafından 2006 yılında nöroblastomalı, 1 yaşındaki bir çocuktan İstanbulda bir *K. pneumoniae* suşundan izole edilmiş yapılan tiplendirme çalışmasında enzimin IMP-1 sub-tipine ait olduğu belirlenmiştir¹⁵³. Eş zamanlı olarak çok uluslu bir antibiyotik direnci çalışma grubu olan SENTRY programının sonuçları yayınlanmış ve ülkemizde bir *E. cloacae* suşunda IMP-1 enziminin tespit edildiği bildirilmiştir¹⁵⁴.

Tüm bu gelişmeler ışığında 2006 yılına kadar en göze çarpıcı olanlar okzasilinaz enzimlerinin baskınlığı ve IMP, VIM tipi β -laktamazların gösterilmesi olduğu söylenebilir. Nitekim bu çalışmalar günümüze kadar devam etmiş özellikle okzasilinazlara yoğunlaşan çalışmalar yapılmıştır¹⁵⁵⁻¹⁶⁰. Özellikle karbapenemazlar konusunda çok yoğun çalışmalar yapmış olan ve 23. ECCMID kongresinde yaşam boyu onur ödülüne layık görülen Patrice Nordmann 2012`de yayınladığı derlemesinde Türkiye`yi OXA-48`in endemik olduğu bir ülke olarak belirtmiştir.

Klinik açıdan okzasilinazlara ve metallo β -laktamazlara oranla daha az tehlikeli olduğu kabul edilen A sınıfı karbapenemazlara baktığımızda ise en önemli tip olan KPC enzimi ülkemizden henüz rapor edilmemiştir. Ancak tüm dünyada *K. pneumoniae* izolatlarında çok sık tesit edilen bu enzimin ülkemizde var olabileceğini tahmin etmek çok zor değildir. Bunun dışında GES enzimi üzerine çalışmalar yapılmış, ülkemizdeki ilk GES enzimini üreten izolat Belçika`ya transfer olmuş bir hastada Bogaerts ve ark. tarafından 2010 yılında gösterilmiştir<sup>161</sup>. Daha sonra 2013 yılında Cicek ve Zeka`nın grubları tarafından iki farklı çalışmada *A. baumannii* izolatları tarafından GES enzimi sentezlendiği bildirilmiştir^{162,163}.

Ülkemizde karbapenemazlarla yapılan çalışmaların genellikle epidemiyolojik veriler sağlayacak tarzda olduğu görülürken az sayıdaki bazı araştırmacılar ise risk faktörleri, yayılım mekanizması yada identifikasyon testlerinin verimliliği üzerine çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalardan biri olan Ergin ve ark.`nın 2013 yılında sonuçlarını yayınladığı çalışmada hastanelerindeki 2004-2010 yılları arasında invaziv *A. baumannii* izolatlarının yayılım mekanizmaları incelenmiş, sonuç olarak karbapenemaz enzimleri arasındaki baskınlığın yıllar içerisinde OXA-58`den OXA-23`e kaydığını ve çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastaneleri uzun bir dönem boyunca persiste edebildiğini rapor etmişlerdir¹⁶⁴. Bir başka çalışmada ise Balci ve ark. 2012 yılında, nozokomiyal *A. baumannii* izolatlarında imipenem direnci ile ilişkili risk faktörlerini araştırmış ve sonuç olarak hastanede yatış süresinin uzamasının, santral kateter varlığının ve önceden karbapenem tedavisi almış olmanın imipenem direnci ile ilişkilendirilebilecek risk faktörleri olduğunu ayrıca hastanelerindeki infeksiyon nedeni *A. baumannii* izolatlarında imipenem direncinin %50 gibi korkutucu düzeylere ulaştığını bildirmişlerdir¹⁶⁵.

2.8. Sonuç

Tüm dünyada karbapenem direnci korkutucu bir boyuta ulaşmış ve yine yeni antibiyotik keşiflerinin beklenildiği eşik bir döneme girilmiştir. Türkiye`de ise yapılan araştırmaların kalite ve sayı açısından az olması hem durumun farklı olduğunu söyleyebilmeyi hem de geleceğe umutla bakmayı zor kılmaktadır. Özellikle metallo β -laktamaz enzimlerinin ülkemizdeki keşfi ve okzasilinazlar açısından endemik kabul edilebilecek düzeye ulaşması endişe verici iken keşfedilmeyi bekleyen ancak sinsice aramızda dolaşan klonların olabileceği gerçeği gözden kaçırılmamalıdır.

Sonuç olarak global antibiyotik direnci sorunu dışında Türkiye özelinde esas problemin araştırma, geliştirme ve uygulama alanında olduğu, bu bağlamda epidemiyolojik çalışmaların artırılmasının yanısıra direnç ve yayılım mekanizmaları üzerine yoğunlaşan çalışmaların desteklenerek sayısının ve kalitesinin artırılması gerektiği ve varolan infeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilerek uygulama aşamasında başarıya götürecek önlemler alınması gerektiği düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Şubat 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında kalan bir yıllık süre zarfında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli klinik ve polikliniklerde alınan örneklerde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri aranmış, tespit edilen örneklerde antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak, PCR ve Dizi Analizi yöntemleriyle genotipik olarak karbapenemaz enzimleri araştırılmıştır.

Çalışma planı şu şekilde oluşturuldu;

1. Merkezlerde karbapenem dirençli gram negatif basil ön tanımlı izolatların tespiti ve Ç.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bölümüne transportu
2. Test suşlarının mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlerle tanımlı olarak doğrulanması, Modifiye Hodge testi ile karbapenem direncinin gösterilmesi ve ileriki çalışmalar için stoklanması
3. CLSI kriterlerine göre Disk Difüzyon metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi
4. Moleküler çalışmalar için DNA eldesi ve PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu
5. Çoğaltılan genlerin Dizi Analizi

3.1. Merkezlerde karbapenem dirençli gram negatif basil ön tanımlı izolatların tespiti ve Ç.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bölümüne transportu

Şubat 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında kalan 1 yıllık süre zarfında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli klinik ve polikliniklere başvuran hastalardan izole edilmiş klinik örneklerde karbapenem direnç gram negatif basiller aranmıştır. Karbapenem dirençli bakterilerin tespiti merkezlerde VITEKII sistemiyle yapılmış, herhangi bir karbapenem direnç

belirlenen gram negatif basiller katı Macconkey Agar veya %7 Koyun kanlı Agar besiyerinde bölümüze en geç 2 gün içerisinde ulaştırılmıştır.

3.2.Test suşlarının mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısıl olarak doğrulanması, Modifiye Hodge testi ile karbapenem direncinin gösterilmesi ve ileriki çalışmalar için stoklanması

Bölüme gelen örnekler ilk olarak tanının doğrulanması amacıyla çeşitli testlere tabii tutulmuştur. Aranılan tür tek tip olmadığından ön tanıya göre rutin mikrobiyolojide kullanılan çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır.

3.2.1. Mikrobiyolojik Testler ve Besiyerleri

3.2.1.1. Gram Boyama

Gram boyama yöntemi şu şekilde uygulanmıştır:

- a) Preparat hazırlandı, kurutuldu ve tespit edildi.
- b) Kristal violet (veya metil violet) solusyonu ile 2-3 dakika boyandı.
- c) Boya döküldü ve preparat üzerine lugol solusyonu konarak 1-2 dakika beklendi. Lugol solusyonu döküldü.
- d) Absolut alkolde dekolere edildi (alkol renksiz akıncaya dek).
- e) Su ile yıkandı.
- f) Safranin (veya eosin, sulu fuchsin) ile 5-10 saniye boyandı.
- g) Su ile yıkanarak boya giderildi.
- h) Kurutma kağıdında (veya havada) kurutuldu.
- i) Sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile muayene edildi. Bu yöntemle mor görülen mikroorganizmalar Gram pozitif ve pembe görülenler de Gram negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.2. Macconkey Besiyeri

Peptone from casein 17,0 g/L

Peptone from meat 3,0 g/L

NaCl 5,0 g/L

Lactose 10,0 g/L

Bile salt mixture 1,5 g/L

Neutral red 0,03 g/L
Crystal violet 0,001 g/L
Agar-agar 13,5 g/L

Hazır karışımını içeren Macconkey Agar (MERCK®-1.05465.0500) damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 45-50 °C'a soğutulup Petri kutularına 12,5'er mL döküldü.

3.2.1.3. Endo Besiyeri

Et ekstresi (MERCK®1.03979)	3 gr
Pepton (DIFCO®63928JB)	1
NaCl (MERCK®1.06400)	5 gr
Agar (LAB M® MC2)	20 gr
Distile Su	1000 ml
(pH 7,3 ± 0,2)	

Karışım 121°C'de 15 dakikada otoklavda steril edildi. Soğuduktan sonra üzerine, %20'lik laktozdan (EGAS® DMV) 50 ml, %10 Na₂SO₃ (SIGMA® 239321)'den 24 ml ve %10 fuksin (SIGMA® B0904)'den 4 ml eklendi.

3.2.1.4. EMB Besiyeri

Peptone 10,0 g/L;
K₂HPO₄ 2,0 g/L;
Lactose 5,0 g/L;
Sucrose 5,0 g/L;
Eosin Y yellowish 0,4 g/L;
Methylene Blue 0,07 g/L;
Agar agar 13,5 g/L.

Hazır karışımını içeren Eosin Metilen Blue Agar (HIMEDIA®-M022-500G) damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 45-50 °C'a soğutulup Petri kutularına 12,5'er ml döküldü.

3.2.1.5. Oksidaz Testi

Bu test yapılırken Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür ayıracı kullanıldı. Bir parça filtre kağıdı %1'lik ayıraç ile ıslatılarak besiyeri plağında üreyen bakteri kolonilerinden öze yardımıyla küçük bir miktar alınarak, ayıraçla ıslatılan bölgeye koloni sürüldü. Açık mavi olan ayıracın rengi koloniden sürüntü yapılan bölgelerde 10-20 sn içinde koyu mavi, laciverde dönüşüyorsa test pozitif kabul edildi.

3.2.1.6. Katalaz Testi

Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze (veya cam baget) yardımı ile yeterli miktarda alınarak temiz ve yağsız bir lamın üzerine konuldu. Sonra buna % 30 luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı veya besiyerinde üremiş kültür üzerine % 3 lük hidrojen peroksid'den 3-4 damla ilave edildi. Hidrojenperoksid katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Şüpheli durumlarda mikroskop altında muayene yapıldı.

3.2.2. Biyokimyasal Testler

3.2.2.1. IMVIC Testleri

İndol, Metil red, Voges-Proskauer ve Sitrat, (Citrat) testlerinin ilk harflerinden oluşmuştur. Vi 'deki "i" küçük harf olarak yazılır ve sadece okuma kolaylığı sağlar. Bu testler koliform grup bakterilerin ayrımı için kullanıldı.

3.2.2.1.1. İndol Testi

Mikroorganizmalar sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37 °C de 1-5 gün inkubasyona bırakıldı. Kültürlerin üzerine kovacs (veya Ehrlich) ayıracından 0.5 ml ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) olarak kabul edildi. Sarımsı halka indolun oluşmadığını gösterdiğinden test sonucu negatif kabul edildi.

3.2.2.1.2. Metil Kırmızısı Testi

Üremiş kültürlerden, besi yerlerine ekimler yapıldı ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakıldı. Üzerine metil kırmızısı solusyonunundan 4-5 damla damlatıldı

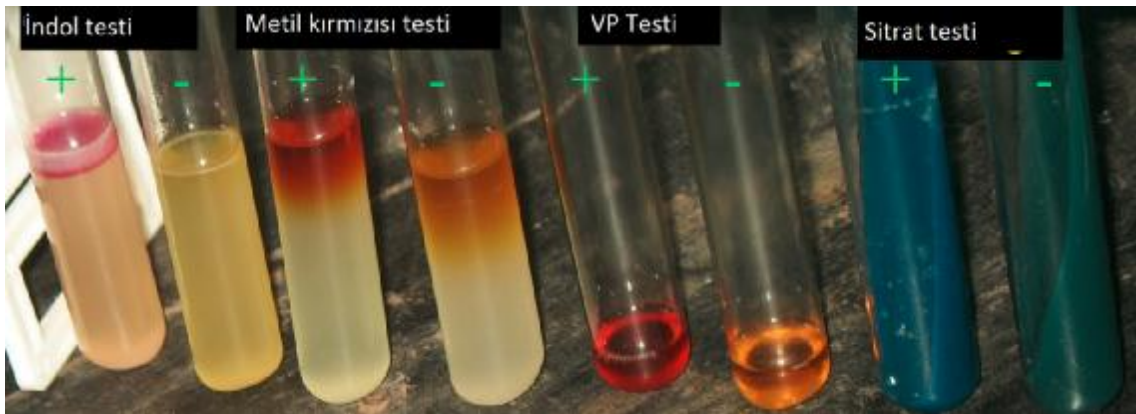
ve iyice karıştırıldı. Metil red, besi yerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil kırmızısı testi olarak kabul edildi. Negatif reaksiyon halinde üst tarafta sarı bir halka görüldü.

3.2.2.1.3. Voges-Proskauer Testi

İçinde glikoz bulunan bufferlı besi yerine kültürlerden ekildi ve 37°C de 2-7 gün inkube edildi. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayrıcağan (O'Meara) 1 ml ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutuldu. Aralıklı olarak hafifçe çalkalandı. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak dikkate alındı.

3.2.2.1.4. Sitrat Testi

Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra besi yerlerine ekimler yapıldı ve tüpler 2-7 gün 37 °C inkubasyonda tutuldu. Besiyerine iğne ile inokulasyon yapıldı ve yatık yüzeye de iğne sürüldü. Simmons citrate besiyerinde, uygun bir inkubasyon süresi sonunda hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.



Şekil 11. IMVIC testinde pozitif ve negatif sonuç alınmış örnekler.

3.2.2.2. BD-CRYSTAL® Enteric/ Non-fermenter İdentifikasyon Testi

BBL Crystal Enteric/Nonfermenter (E/NF) Identification (ID) System (Enterik/Fermente Etmeyen (E/NF) Tanımlama (ID) Sistemi), *Enterobacteriaceae* ailesine ait aerobik gram negatif bakterinin ve bazı daha sık izole edilen, glikozu fermente eden ve fermente etmeyen gram negatif basilin tanımlanmasına yöneliktir. BBL Crystal E/NF ID Sistemi küçültülmüş bir tanımlama yöntemidir. Kullanılan pek çok test, klasik yöntemlerin modifikasyonudur. Bunların arasında fermantasyon, oksidasyon ve çeşitli substratlar için degradasyon ve hidroliz testleri yer alır. Ayrıca mikropların çeşitli substratları metabolize etmek için kullandığı enzimleri tespit etmek için kromojen bağlı substratlar da bulunmaktadır.

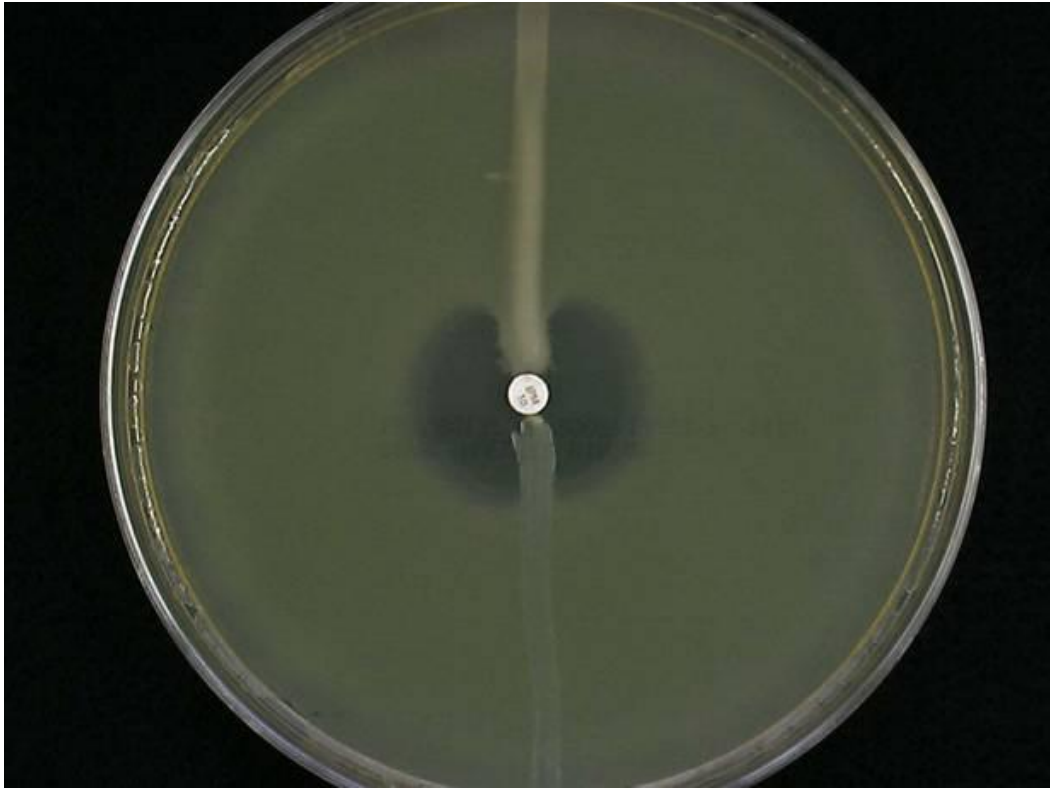
Bir inkübasyon sürecinin ardından kuyucuklar renk değişimleri açısından incelendi. Sonuçta ortaya çıkan 30 reaksiyonluk model, tanımlama işleminin temeli olarak kullanılan on haneli profil numarasına dönüştürüldü. Geniş bir yelpazedeki mikroorganizmaları kapsayan 30 BBL Crystal E/NF ID substratının biyokimyasal ve enzimatik reaksiyon modelleri BBL Crystal E/NF ID veritabanında saklandı. Tanımlama işlemi, test izolatu reaksiyon modelinin veritabanında tutulanlarla karşılaştırmalı olarak analiz edilmesinden türetildi.



Şekil12. BBL Crystal Enteric/Nonfermenter (E/NF) Identification (ID) System (Enterik/Fermente Etmeyen (E/NF) Tanımlama (ID) Sistemi), ile *Enterobacteriaceae* ailesine ait aerobik gram negatif bakterinin tanımlanması. Alt tarafta plak görülmektedir.

3.2.3. Modifiye Hodge Testi ile karbapenem direncinin doğrulanması

Test, IPM'ye duyarlı bir bakteri kökeninin, karbapenemaz üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu IPM varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testte IPM'ye duyarlı bakteri kökeni olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. *E. coli* kökeninin kanlı agardaki taze kültüründen MHB'ye 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu yapıldı. Ardından bakteri süspansiyonunun MHB'de 1:10 sulandırımı yapılarak, steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben besiyerinin merkezine IPM diskierleştirildi. Test edilecek kökenin kanlı agardaki taze kültüründen öze ilebakteri kolonileri toplandı ve IPM diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif, biri negatif kontrol olmak üzere toplam iki izolat çalışılmış oldu. Inokülasyonu takiben plaklar 35°C - 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Standart *E. coli* kökenine bağlı oluşan inhibisyon zonunun test suşunun üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E. coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.



Şekil 13. Modifiye Hodge Testi yapılmış iki izolatın görünümü. Üstteki izolat karbapenemaz pozitif alttaki izolat ise negatiftir.

3.2.3.1. Mueller-Hinton Broth

Meat infusion 2,0 g/L

Casein hydrolysate 17,5 g/L

Starch 1,5 g/L

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

3.2.3.2. Mueller-Hinton Agar

Meat infusion 2,0 g/L

Casein hydrolysate 17,5 g/L

Starch 1,5 g/L

Agar-agar 13,0 g/L.

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

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

İzolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırıldığı Kirby-Bauer Disk Difüzyon testi CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) kriterleri Ocak 2013'te yayınlanan "Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23)" rehberinde yer alan Tablo 2A-Zone diameter and Minimal inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standarts for *Enterobacteriaceae*'daki önerilere göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. CLSI'n *Enterobacteriaceae* için antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere belirlediği zon çapları.

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

3.3.1. Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi

Çalışmaya alınan kökenlerin “Clinical Laboratory Standards Institute” kriterlerine göre, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çeşitli antibiyotikler için sınır değerleri ölçüldü (Tablo 4 ve 5). 18–20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri kullanıldı. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden MHB’de 0.5 McFarland bulanıklığında (108CFU/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben antibiyotik diskleri birbirinden en az 22 mm uzaklık olacak şekilde besiyeri üzerine yerleştirildi. Bir gece 35°C -37°C’lik etüvde 18-20 saat inkübe edildi. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek değerlendirildi.



Şekil 14. Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonucu test edilen bütün antibiyotiklere dirençli olduğu görülen bir test izolatu.

3.3.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kirby-Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri, kısaltmaları ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Kısaltma	Disk Difüzyon yönteminde kullanılacak diskin antibiyotik içeriği
Penisilinler		
Ampisilin	AM	10 µg
B-laktam+betalaktamaz kombinasyonları		
Ampisilin+Sulbaktam	SAM	10/10 µg
Amoksisilin+Klavulanat	AMC	20/10 µg
Piperasilin+Tazobaktam	TPZ	100/10 µg
Sefalosporinler		
Sefotaksim	CTX	30 µg
Sefoksitin	FOX	30 µg
Sefepim	FEP	30 µg
Monobaktam		
Aztreonam	ATM	30 µg
Karbapenemler		
Ertapenem	ETP	10 µg
Imipenem	IPM	10 µg
Meropenem	MEM	10 µg
Aminoglikozidler		
Gentamisin	CN	10 µg
Tetrasiklinler		
Tetrasiklin	TE	30 µg
Florokinolonlar		
Siprofloksasin	CIP	5 µg
Folat yolu antagonistleri		
Trimetoprim+Sulfometaksazol	SXT	1,25/23,75 µg
Polimiksinler		
Kolistin	CL	10 µg

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

3.4.1. Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve enzimler

3.4.1.1. TE Buffer

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

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

Distile Su:100 ml

(pH 8.0)

3.4.1.2. dNTP Karışımı

(25µmol her biri) (Fermentas R0181)

(2,5 mM herbiri, toplam 10mM)

dATP (100 mM): 25 µl

dCTP (100 mM): 25 µl

dGTP (100 mM): 25 µl

dTTP (100 mM): 25 µl

Distile su: 900 µl.

-20°C' de saklandı.

3.4.1.3. Marker

Gene Ruler 200bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Fermentas SM0323)

3.4.1.4. Taq DNA polimeraz enzimi

(Fermentas EP0402) 5U/ µl

10X PCR tampon çözelti

25 mM MgCl₂

3.4.1.5. 10xTBE Solüsyonu

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

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500): 55gr

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

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

3.4.1.6. Etidyum bromid

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

Distile su: 100ml

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

3.4.2. DNA Eldesi

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

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



Şekil 15. DNA ölçümlerinin yapıldığı Spektrofotometre cihazı.

3.4.3. PCR ile karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu

Ekstrakte edilen DNA örnekleri ilk önce karbapenemaz genlerinin varlığı açısından değerlendirilmek üzere Tablo 6'daki primerler kullanılarak multiplex-PCR ile amplifikasyona sokuldu. Daha sonra dizi analizi ile tiplendirilmesi gerektiği düşünülen örneklerle daha spesifik olan Tablo 7'deki primerlerle tekrar tüm gen bölgesi amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon şartları GenBank'tan alınan tüm karbapenemaz gruplarını temsil eden referans diziler BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) düzenlendi.

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

94°C’de 3 dak. ilk denaturasyon
94°C’de 30 sn. denaturasyon
55-60°C’de 40 sn. bağlanma (annealing) 40 siklus
72°C’de 40 sn. uzama (extension)
72°C’de 10 dak. son uzama

Sonuçların değerlendirilmesi için, 1X TBE içinde % 1,5 agaroz jel hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. 50 ml eriyik içine 5 mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5 µl eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. PCR ürünleri jel yükleme tamponu ile 1/5 oranında (3 µl jel yükleme tampon çözeltisi + 15 µl çoğaltılmış ürün) karıştırılarak her bir kuyuya 18 µl, ardışık iki kuyuyada GeneRuler 50 ve 100 bp DNA Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 120 V uygulanarak 60 dakika yürütüldü (Şekil 16). Sonuçlar UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.

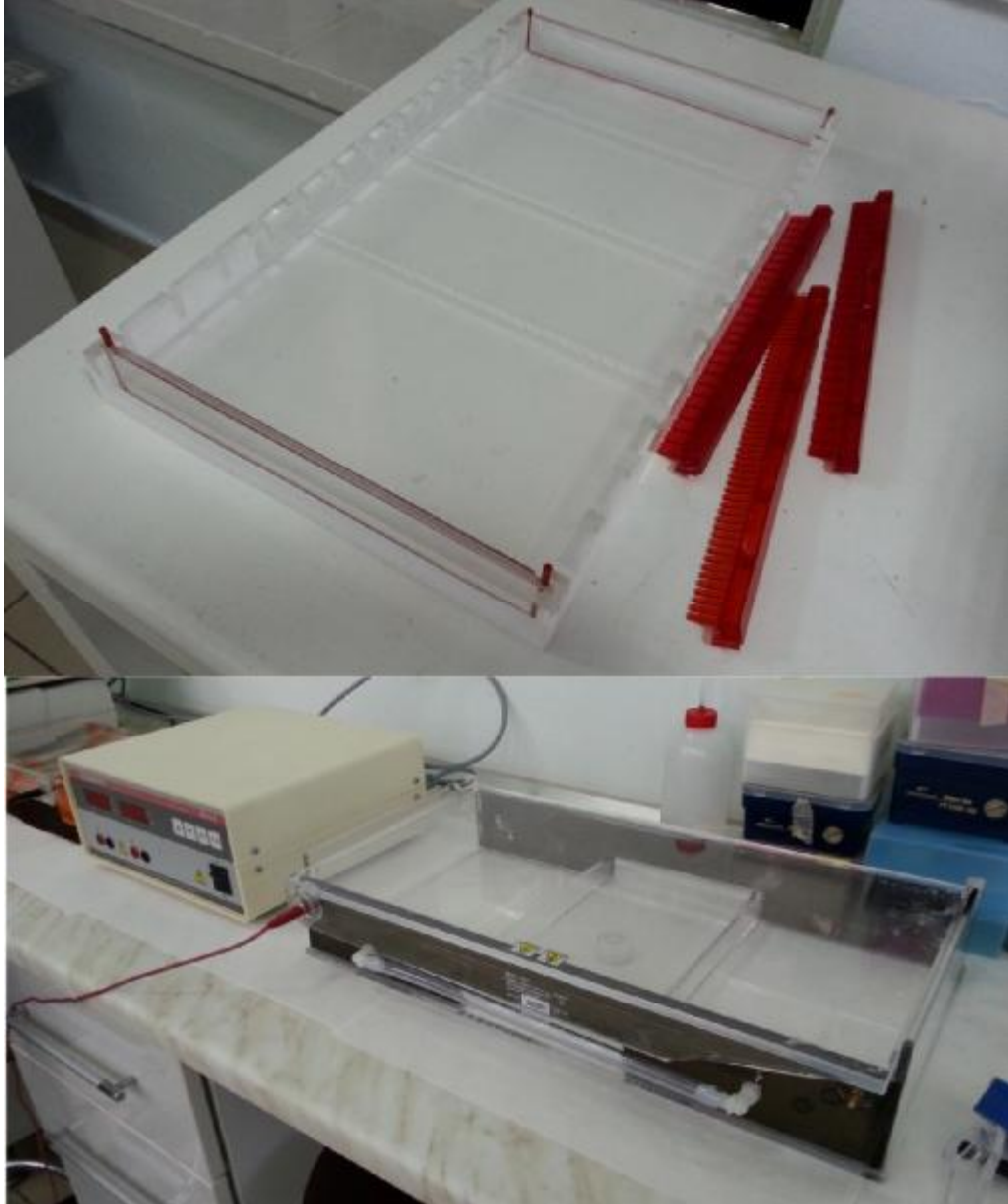
Tablo 6. Multiplex-PCR`da kullanılan primerler^{166, 167}

PCR set ismi ve hedeflenen β -laktamaz genleri	Primer İsmi	(5'–3') Dizilim	Amplikon
<u>Multiplex I</u> TEM, SHV ve OXA-1-like	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800 bp
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713 bp
	MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564 bp
	MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
<u>Multiplex II</u> CTX-M group 1, group 2 ve group 9	MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688 bp
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	404 bp
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561 bp
	MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG	
CTX-M group 8/25	CTX-Mg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC	326 bp
	CTX-Mg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGTAT	
<u>Multiplex III</u> ACC, FOX, MOX, DHA, CIT ve EBC	MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346 bp
	MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC	
	MultiCaseFOX_for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	162 bp
	MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGGCCAGGTGA	
	MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	895 bp
	MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	
	MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997 bp
	MultiCaseDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCTGGTATTCG	
	MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538 bp
	MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY	
	MultiCaseEBC_for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683 bp
	MultiCaseEBC_rev	AGCCTAACCCTGATACA	
<u>Multiplex IV</u> VEB, PER ve GES	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399 bp
	MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
	MultiPER_for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520 bp
	MultiPER_rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	
	MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648 bp
	MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	
<u>Multiplex V</u> GES ve OXA-48-like	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399 bp
	MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
	MultiOXA-48_for	GCTTGATCGCCCTCGATT	281 bp
	MultiOXA-48_rev	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	

<u>Multiplex VI</u> IMP, VIM ve KPC	MultiIMP_for	TTGACACTCCATTTACDG	139 bp
	MultiIMP_rev	GATYGAGAATTAAGCCACYCT	
	MultiVIM_forc	GATGGTGTITGGTCGCATA	390 bp
	MultiVIM_rev	CGAATGCGCAGCACCAG	
	MultiKPC_for	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	538 bp
	MultiKPC_rev	ACGACGGCATAGTCATTTGC	
<u>MGA</u> SME-1 SME-3 IMI-1 IMI-3, NMC-A	SME-GAM-F	GAGGAAGACTTTGATGGGAGGAT	334 bp
	SME-GAM-R	TCCCCTCAGGACCGCCAAG	
	IMI-GS-F	GGTGTCTACGCTTTAGACACTGGCTC	536 bp
	IMI-GS-R	GCACGAATACGCGCTGCACCGG	
<u>MGB</u> GIM-1 SIM-1 NDM-1 SPM-1	GIM-GBM-F	CGTTGCCAGCTTTAGCTCAGG	279 bp
	GIM-GBM-R	GCAACTTGATACCAGCAGTGCG	
	SIM-GBM-F	TTGCGGAAGAAGCCCAGCCAG	613 bp
	SIM-GBM-R	GCGTCTCCGATTTCACTGTGGC	
	NDM-GBM-F	CCCGGCCACACCAGTGACA	129 bp
	NDM-GBM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	
	SPM-GBM-F	GGGTGGCTAAGACTATGAAGCC	447 bp
	SPM-GBM-R	GCCGCCGAGCTGAATCGG	
<u>MGD1</u> OXA-23, -27, -49, -73, -133, -146 OXA-24 (= -33, -40), -25, -26, -72, -139, -160 and [OXA-143, -182] OXA-48, -54 ve [OXA-181]	O23-GDM-F	CCTGATCGGATTGGAGAACCAG	516 bp
	O23-GDM-R	GATGCCGGCATTTCTGACCG	
	O24-GDM-F	GGTCGATAATTTTGGTTAGTTGGCCC	237 bp
	O24-GDM-R	CCATTAGCTTGCTCCACCCAACCAG	
	O48-GDM-F	CCAAGCATTTTTACCCGCATC	389 bp
	O48-GDM-R	GYTTGACCATACGCTGRCTGCG	
<u>MGD2</u> OXA-1 (=30), -31, -47 OXA-2, -3, -15, -21, -32, -34, -36, -46, -53, -141, -144, -161 ve [OXA-118, -119] OXA-51 groupf	O1-GD2M-F	CAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCG	198 bp
	O1-GD2M-R	GCTGTRAATCCTGCACCAGTTTCCC	
	O2-GD2M-F	GACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCG	256 bp
	O2-GD2M-R	CYTTGACCAAGCGCTGATGTT	
	O51-GD2M-F	GACCGAGTATGTACCTGCTTCGACC	497 bp
	O51-GD2M-R	GAGGCTGAACAACCCATCCAGTTAACC	
<u>MGD3</u> OXA-10 groupg ve [OXA-5] OXA-58, -96, -97, -164	O10-GD3M-F	CGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAG	138 bp
	O10-GD3M-R	GAAACTCCACTTGATTAAGTCCGG	
	O58-GD3M-F	GTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGC	630 bp
	O58-GD3M-R	GGTCTACAGCCATTCGCCAGCC	
Y=T or C; R=A or G; S=G or C; D=A or G or T.			

Tablo 7. PCR`la karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan primerler⁴⁸.

Enzim ailesi	Primer	Primer Dizisi (5"-3")	amplikon boyutu
A sınıfı karbapenemazlar			
NMC	NMC1	GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA	2158
	NMC4	CGGTGATAAAATCACACTGAGCATA	
IMI	IMI-A	ATAGCCATCCTTGTTTAGCTC	818
	IMI-B	TCTGCGATTACTTTATCCTC	
KPC	KPCf	ATGTCACGTGTATCGCCGTCT	893
	KPCr	TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
GES	GESc	GTTTTGCAATGTGCTCAACG	371
	GESd	TGCCATAGCAATAGGCGTAG	
B sınıfı Karbapenemazlar			
IMP-1	f	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	740
	r	TTAGTTGCTTGTTTTGATG	
IMP-2	f	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	737
	r	TAGTTACTTGGCTGTGATGG	
VIM-1	f	TTATGGAGCAGCAACCGATGT	920
	r	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA	
VIM-2	f	AAAGTTATGCCGCACTCACC	865
	r	TGCAACTTCATGTTATGCCG	
SPM-1	SPM-1f	CCTACAATCTAACGGCGACC	650
	SPM-1r	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	
GIM-1	GIM-1f	AGAACCTTGACCGAACGCAG	748
	GIM-1r	ACTCATGACTCCTCACGAGG	
SIM-1	SIM-1f	TACAAGGGATTTCGGCATCG	570
	SIM-1r	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
NDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
D sınıfı karbapenemazlar			
OXA-48	OXA-48-V	CGCTTCCACCCTAATTG	
	OXA-48-R	TACAAGCGCATCGAGCAT	



Şekil 16. Elektroforez işlemlerinin uygulandığı sistemler. Üstte 150 örnek kapasiteli jel kalıbı, altta ise güç kaynağı ve elektroforez tankı görülmektedir.

3.5. Çoğaltılan genlerin Dizi Analizi

3.5.1. PCR ürünlerinin saflaştırılması

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

1. Steril 1,5 ml tüp içersine, her 1µl PCR ürünü için 4µl SG solüsyonu (DNA immobilizasyonunu sağlar, pH 6,6) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
2. Karışım SentroSpin kolonuna (Aritma filtresi içeren ve toplama tüpünün içine yerleşen kolon) aktarıldı, 13000 rpm`de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
3. Sentrospin kolonuna 500µl Solüsyon SW (DNA`nın arıtılmasını sağlar, pH 7,5) eklendi, 13000 rpm`de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü. İşlem tekrarlandı.
4. Arıtma işleminden sonra SentroSpin kolonu 13000 rpm`de 1 dakika boş olarak santrifüj edilerek kalan etanol uzaklaştırıldı.
5. Sentrospin kolonu 1,5 ml`lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek başlangıç PCR ürünü miktarı kadar Solüsyon SE (DNA`nın toplanmasını sağlar, pH 8,5) eklendi. SE solüsyonu kolonun tam ortasına eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi ve 13000 rpm`de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.

Bu saflaştırılmış DNA örnekleri spektrofotometrede DNA kantitasyonu yapıldıktan sonra dizi analizi çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20°C`de saklandı.



Şekil 17. Saflaştırma işlemlerinde kullanılan hazır SENTROMER® saflaştırma kiti.

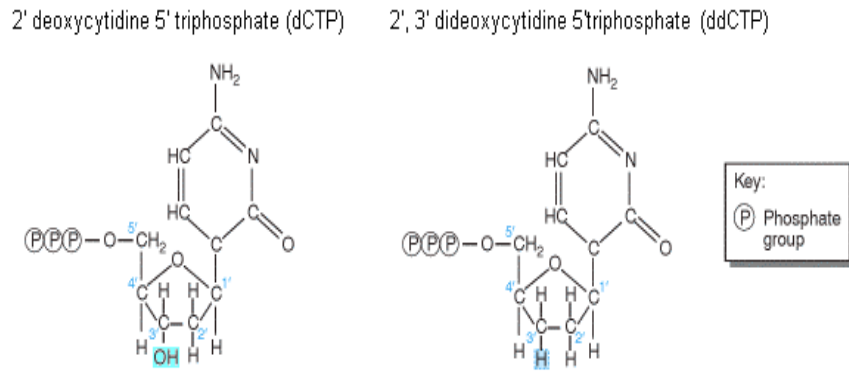
3.5.2. Dizi analizi çalışmaları

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

3.5.2.1. F.Sanger`in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi

Bu yöntemde dizisi belirlenecek olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA`nın çoğaltılmasında Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz veya sequenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir.

Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP` lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3` pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP` leride (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır.ddNTP`ler 3` uçlarında hidroksil grubu yerine H atomu içerdiğinden DNA polimerazın aktivitesinin durmasına neden olur ve buda hibridizasyon sırasında zincir uzamasının durmasına yol açar.

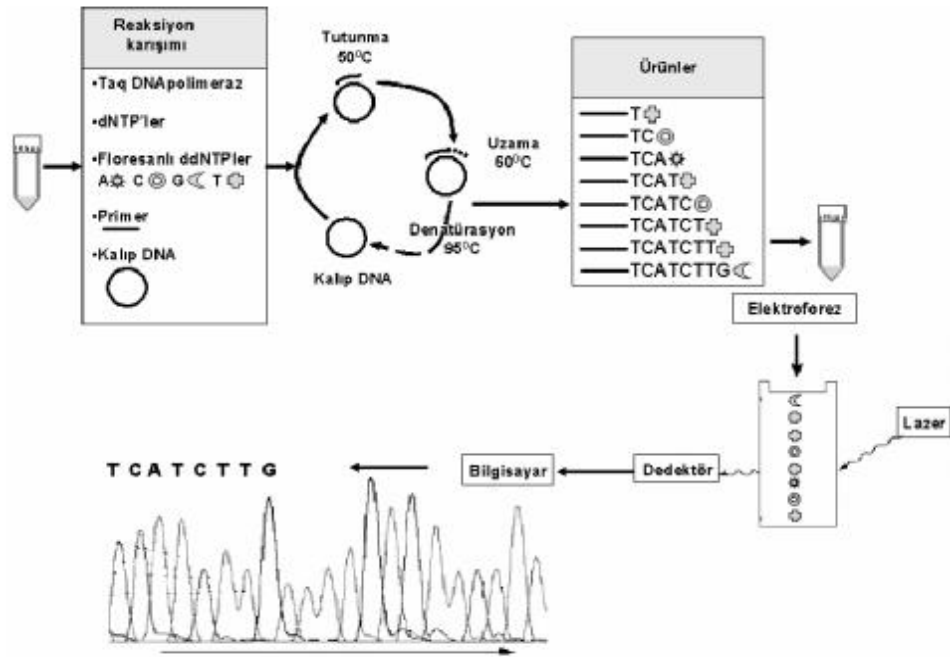


Şekil 18. Solda normal bir dCTP molekülü,sağda ise bir dideoksinükleotid olan ddCTP molekülü görülmektedir.

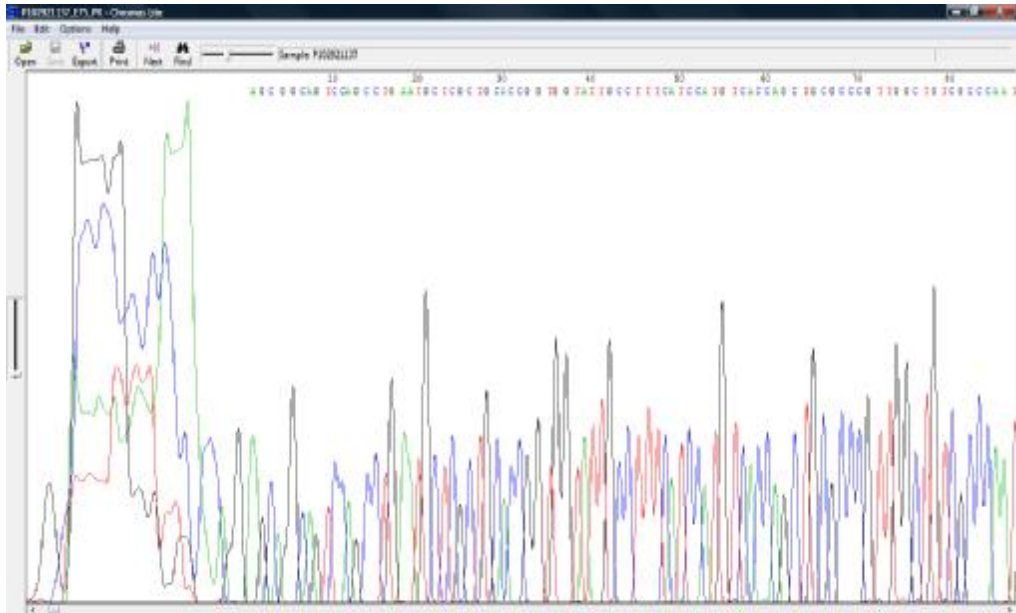
Otomatize DNA dizi analizi şu aşamalardan oluşmaktadır:

1. Özgül primerin dizi analizi yapılacak hedef DNA kalıbına tutunması
2. Floresan boyalı ddNTP ve dNTP`lerin karışıma ilave edilerek DNA polimeraz aktivitesiyle yeni kalıp DNA`ya komplementer DNA zincirinin sentezi
3. Yeni sentezlenen DNA iplikçiği'nin sekans-spesifik bir ddNTP ile sonlanması
4. Oluşan ürünlerin kapiller elektroforezde yürütülmesi

Zincir sonlandırma yöntemine dayanan otomatize DNA dizi analizinde PCR ile çoğaltılan saf haldeki hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunacak bir primer kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi bu karışıma eklendiğinde primerin tutunduğu kalıp deoksिनुकлеотид trifosfat (dNTP) varlığında sentez reaksiyonunu başlatır. Reaksiyon tüpünde ayrıca herbiri farklı floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP'ler bulunmaktadır. Hibridizasyon sırasında ddNTP'ler yeni sentezlenen iplikçiğe eklendiğinde sentez duracağından DNA zincirinin daha fazla uzaması engellenir. Sekans spesifik olarak sonlandırılan DNA dizileri kapiller elektroforez ile yürütülür. Bu işlem sırasında sonlanan her bir dizide bulunan ddNTP'lerin yaydığı farklı dalga boyundaki floresanslar sistemde bulunan dedektör tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir (Şekil 20). Otomatize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları Şekil 19'te şematize edilmiştir.



Şekil 19. Otomatize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları.



3.5.3. Dizi Analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

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

4. BULGULAR

Çalışmamızda Şubat 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında kalan 1 yıllık süre zarfında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli klinik ve polikliniklerde alınan örneklerde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri aranmış, tespit edilen örneklerde antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak, PCR ve Dizi Analizi yöntemleriyle genotipik olarak karbapenemaz enzimleri araştırılmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Örneklerin merkezlere göre dağılımı

Merkez	Gönderilen Toplam Örnek Sayısı
Çukurova Ü.Tıp Fakültesi	91
Başkent Ü.Tıp Fak.Araş.Hast.	25
Mustafa Kemal Ü.Tıp Fak.	56

Merkezlerden toplanan örnekler çeşitli kriterlere göre değerlendirilmiş çalışma karbapenem direnci şüphesi ile bölümümüze gönderilen izolatlar tanı doğrulamasından sonra, MHT ile karbapenemaz üretimi ve genotipik olarak karbapenemaz genlerinin araştırılması amacıyla stoklanmıştır. Karbapenem direnci açısından çalışılan klinik örneklerle ait yaş, cinsiyet, örnek alınan merkez ve bölüm, klinik materyal bilgileri Tablo 9`da verilmiştir.

Tablo 9. 3 merkezden toplanan örneklere ait bilgiler. Tanı ve antibiyotik direnç verileri hastanelerin kendi tanımlama sistemi olan VITEK II verileridir. Tezde bölüm laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalar sonucu elde edilen veriler esas alınmıştır.

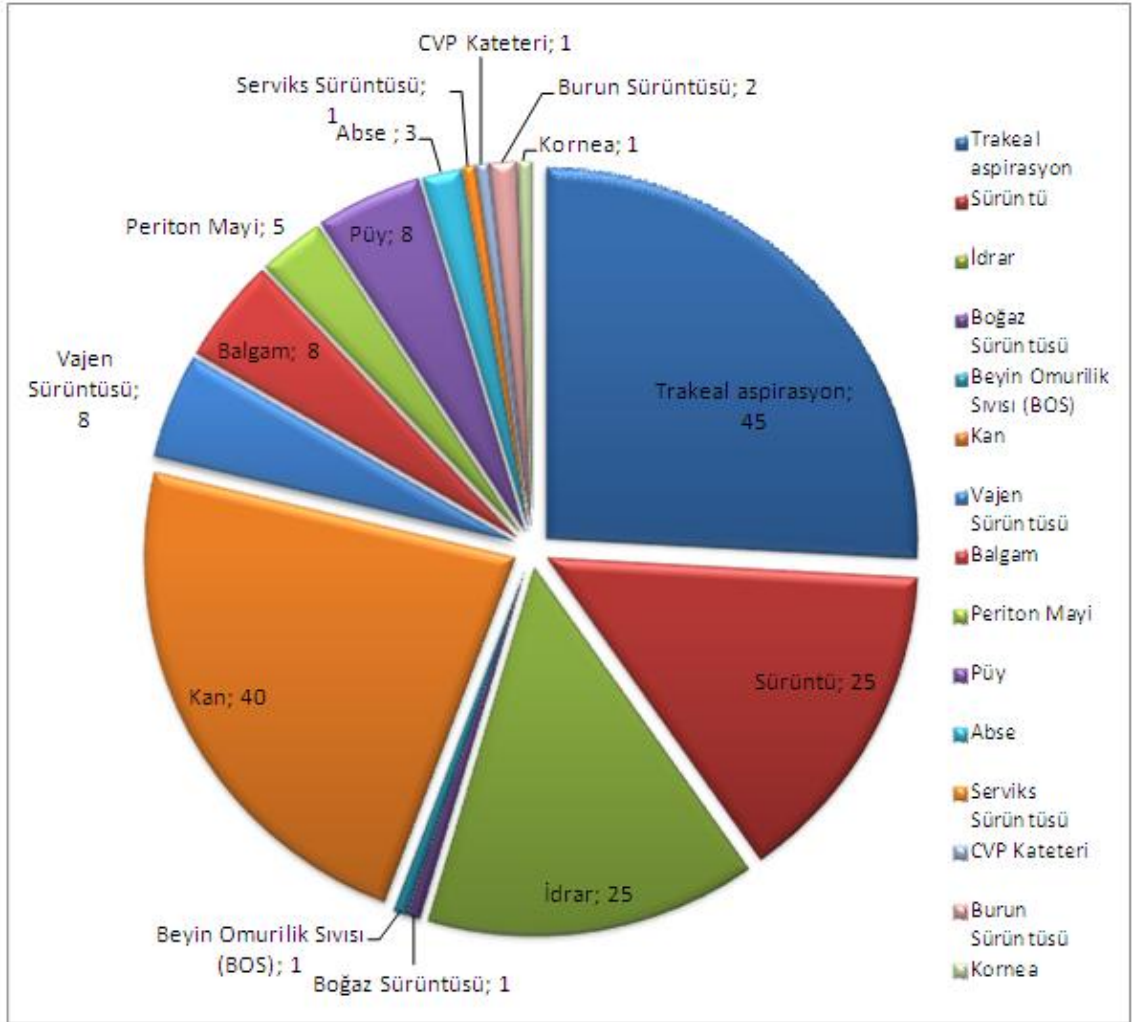
od	Merkez	Cinsiyet	Yaş	Ünite	Materyal
1	Ç.Ü.T.F.	E	1	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
2	Ç.Ü.T.F.	E	46	Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon
3	Ç.Ü.T.F.	E	22	Yanık Ünitesi	Sürüntü
4	Ç.Ü.T.F.	E	5	Yanık Ünitesi	Sürüntü
5	Ç.Ü.T.F.	E	47	Reanimasyon	BAL
6	Ç.Ü.T.F.	E	53	Nöroloji Servisi	Sürüntü
7	Ç.Ü.T.F.	K	36	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
8	Ç.Ü.T.F.	E	26	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
9	Ç.Ü.T.F.	K	28	Yanık Ünitesi	Sürüntü
10	Ç.Ü.T.F.	E	53	Dahiliye Yoğun Bakım-2	trakeal Aspirasyon
11	Ç.Ü.T.F.	E	46	Beyin Cerrahi yoğun bakım	İdrar
12	Ç.Ü.T.F.	E	37	Dahiliye romatoloji ve İmm . Ser	Plevral Mayi
13	Ç.Ü.T.F.	E	7	Çocuk Sağlığı 2 servisi	Trakeal Aspirasyon
14	Ç.Ü.T.F.	K	4	Çocuk Alerji-İmmunoloji Poliklinik	Boğaz sürüntüsü
15	Ç.Ü.T.F.	K	35	Dahiliye Onkoloji Servisi	BOS(steril vücut sıvısı)
16	Ç.Ü.T.F.	E	71	Üroloji Servisi	İdrar
17	Ç.Ü.T.F.	E	13	Çocuk Nefroloji Polikliniği	İdrar
18	Ç.Ü.T.F.	E	26	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
19	Ç.Ü.T.F.	K	45	K hastalıkları ve Doğum Polikli.	Vajen Sürüntüsü
20	Ç.Ü.T.F.	K	81	K hastalıkları ve Doğum Polikli.	Vajen Sürüntüsü
21	Ç.Ü.T.F.	E	4	Çocuk Nefroloji Polikliniği	İdrar
22	Ç.Ü.T.F.	E	27	Genel Cerrahi Servisi-2	sürüntü
23	Ç.Ü.T.F.	E	13	Çocuk Hematoloji Servisi	Kan
24	Ç.Ü.T.F.	E	56	Dahiliye Onkoloji servisi	Kan
25	Ç.Ü.T.F.	E	0	Çocuk yenidoğan 1 Servisi	Trakeal Aspirasyon
26	Ç.Ü.T.F.	E	61	Dahiliye Gastroentoloji Servisi	Balgam
27	Ç.Ü.T.F.	E	46	Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon
28	Ç.Ü.T.F.	K	70	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Vajen Sürüntüsü
29	Ç.Ü.T.F.	E	65	Dahiliye Hematoloji Servisi	İdrar
30	Ç.Ü.T.F.	E	56	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
31	Ç.Ü.T.F.	K	65	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
32	Ç.Ü.T.F.	K	59	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
33	Ç.Ü.T.F.	E	20	Yanık Ünitesi	Sürüntü
34	Ç.Ü.T.F.	E	55	Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon
35	Ç.Ü.T.F.	E	15	Çocuk Sağlığı 1 servisi	Balgam
36	Ç.Ü.T.F.	E	51	Dahiliye Gastroentoloji Servisi	Periton Mayi
37	Ç.Ü.T.F.	E	47	Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon
38	Ç.Ü.T.F.	K	36	K hastalıkları ve Doğum Polikli.	Vajen Sürüntüsü
39	Ç.Ü.T.F.	K	49	K hastalıkları ve Doğum Polikli.	Vajen Sürüntüsü
40	Ç.Ü.T.F.	E	71	Dahiliye Onkoloji Servisi	İdrar
41	Ç.Ü.T.F.	K	42	Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	İdrar
42	Ç.Ü.T.F.	K	41	K hastalıkları ve Doğum Polikli.	Vajen sürüntüsü
43	Ç.Ü.T.F.	K	4	Yanık Ünitesi	Sürüntü
44	Ç.Ü.T.F.	K	5	Yanık Ünitesi	Kan
45	Ç.Ü.T.F.	E	19	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Balgam
46	Ç.Ü.T.F.	E	73	Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	Püü
47	Ç.Ü.T.F.	E	48	Plastik ve Rekonstrüktif Cerr. Servis	Püü
48	Ç.Ü.T.F.	E	19	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Balgam
49	Ç.Ü.T.F.	E	51	Dahiliye Gastroentoloji Servisi	Kan
50	Ç.Ü.T.F.	E	1	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
51	Ç.Ü.T.F.	K	4	Yanık Ünitesi	Sürüntü
52	Ç.Ü.T.F.	K	59	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
53	Ç.Ü.T.F.	E	46	Dahiliye Hematoloji Servisi	Kan
54	Ç.Ü.T.F.	E	32	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Püü
55	Ç.Ü.T.F.	K	30	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Sürüntü
56	Ç.Ü.T.F.	K	0	Süt çocuğu Servisi	Sürüntü

57	Ç.Ü.T.F.	K	72	Dahiliye Nefroloji Servisi	İdrar
58	Ç.Ü.T.F.	K	59	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
59	Ç.Ü.T.F.	K	58	Göğüs Hastalıkları Servisi	Balgam
60	Ç.Ü.T.F.	K	5	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
61	Ç.Ü.T.F.	E	55	Reanimasyon	Trakeal Aspirasyon
62	Ç.Ü.T.F.	E	20	Yanık Ünitesi	Sürüntü
63	Ç.Ü.T.F.	E	22	Yanık Ünitesi	Sürüntü
64	Ç.Ü.T.F.	K	5	Yanık Ünitesi	Sürüntü
65	Ç.Ü.T.F.	K	5	Yanık Ünitesi	Sürüntü
66	Ç.Ü.T.F.	K	5	Yanık Ünitesi	Sürüntü
67	Ç.Ü.T.F.	K	9	Çocuk Yoğun Bakım	Kan
68	Ç.Ü.T.F.	K	59	Dahiliye Yoğun Bakım-2	kan
69	Ç.Ü.T.F.	K	59	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
70	Ç.Ü.T.F.	E	26	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
71	Ç.Ü.T.F.	E	7	Çocuk Sağlığı 2 servisi	Trakeal Aspirasyon
72	Ç.Ü.T.F.	K	12	Çocuk Cerrahi Servisi	İdrar
73	Ç.Ü.T.F.	E	37	Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	İdrar
74	Ç.Ü.T.F.	E	72	Reanimasyon	BAL
75	Ç.Ü.T.F.	K	5	Yanık Ünitesi	Kan
76	Ç.Ü.T.F.	E	71	Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	Abse
77	Ç.Ü.T.F.	K	50	Dermatoloji Servisi	Püy
78	Ç.Ü.T.F.	K	11	Çocuk Nefroloji Polikliniği	İdrar
79	Ç.Ü.T.F.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
80	Ç.Ü.T.F.	K	0	Kalp Damar Cerrahi Post-Op Bakım Ü	Trakeal Aspirasyon
81	Ç.Ü.T.F.	E	1	Çocuk Acil Tıp	İdrar
82	Ç.Ü.T.F.	E	52	Göğüs Hastalıkları Servisi	Balgam
83	Ç.Ü.T.F.	E	57	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
84	Ç.Ü.T.F.	E	32	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Trakeal Aspirasyon
85	Ç.Ü.T.F.	E	57	Dahiliye Onkoloji Servisi	Balgam
86	Ç.Ü.T.F.	K	31	Doğumhane	Vajen Sürüntüsü
87	Ç.Ü.T.F.	E	23	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
88	Ç.Ü.T.F.	E	32	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Trakeal Aspirasyon
89	Ç.Ü.T.F.	E	23	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
90	Ç.Ü.T.F.	E	1	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
91	B.Ü.T.F.A.H.	K	3	Servis bilgisi mevcut değil	Sürüntü
92	B.Ü.T.F.A.H.	E	64	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
93	B.Ü.T.F.A.H.	E	55	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
94	B.Ü.T.F.A.H.	E	19	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
95	B.Ü.T.F.A.H.	K	32	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
96	B.Ü.T.F.A.H.	K	32	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
97	B.Ü.T.F.A.H.	K	32	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
98	B.Ü.T.F.A.H.	K	65	Servis bilgisi mevcut değil	İdrar
99	B.Ü.T.F.A.H.	K	15	Servis bilgisi mevcut değil	Püy
100	B.Ü.T.F.A.H.	K	62	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
101	B.Ü.T.F.A.H.	E	50	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
102	B.Ü.T.F.A.H.	K	73	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
103	B.Ü.T.F.A.H.	K	59	Servis bilgisi mevcut değil	Vajen Sürüntüsü
104	B.Ü.T.F.A.H.	E	19	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
105	B.Ü.T.F.A.H.	E	66	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
106	B.Ü.T.F.A.H.	E	53	Servis bilgisi mevcut değil	Abse
107	B.Ü.T.F.A.H.	E	79	Servis bilgisi mevcut değil	Kan
108	B.Ü.T.F.A.H.	E	66	Servis bilgisi mevcut değil	püy
109	B.Ü.T.F.A.H.	K	15	Servis bilgisi mevcut değil	püy
110	B.Ü.T.F.A.H.	K	37	Servis bilgisi mevcut değil	İdrar
111	B.Ü.T.F.A.H.	E	48	Servis bilgisi mevcut değil	Abse
112	B.Ü.T.F.A.H.	E	76	Servis bilgisi mevcut değil	kan
113	B.Ü.T.F.A.H.	K	0	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
114	B.Ü.T.F.A.H.	K	8	Servis bilgisi mevcut değil	Trakeal Aspirasyon
115	B.Ü.T.F.A.H.	E	52	Servis bilgisi mevcut değil	Sürüntü
116	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	23	Reanimasyon	BAL

117	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	37	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
118	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	37	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
119	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	67	Kardiyoloji Servisi	İdrar
120	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	36	Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon H	BAL
121	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	44	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
122	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	18	Çocuk Enfeksiyon Servisi	Burun Sürüntüsü
123	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	18	Çocuk Enfeksiyon Servisi	Burun Sürüntüsü
124	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	62	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Kan
125	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	17	Üroloji Polikliniği	İdrar
126	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	17	Üroloji Polikliniği	İdrar
127	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	55	Dahiliye Hematoloji Servisi	Kan
128	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	6	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
129	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	6	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
130	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
131	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
132	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
133	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	69	Dahiliye Nefroloji Servisi	BAL
134	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	23	Reanimasyon	Kan
135	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	43	Fiziksel Tıp-Rehabilitasyon Servisi	İdrar
136	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	19	Nöroloji Yoğun Bakım	İdrar
137	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	19	Nöroloji Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
138	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	55	Dahiliye Hematoloji Servisi	Kan
139	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	37	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
140	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	33	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Periton Mayı
141	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	57	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
142	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	4	Çocuk Sağlığı 1 servisi	Trakeal Aspirasyon
143	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	56	Göz Hastalıkları Servisi	Kornea
144	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
145	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	23	Reanimasyon	Sürüntü
146	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	55	Dahiliye Onkoloji Servisi	Sürüntü
147	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	57	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
148	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
149	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	73	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Sürüntü
150	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	64	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Trakeal Aspirasyon
151	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	28	Nöroloji Yoğun Bakım	İdrar
152	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	63	Dahiliye Onkoloji Servisi	Kan
153	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	55	Dahiliye Hematoloji Servisi	Kan
154	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	22	Fiziksel Tıp-Rehabilitasyon Servisi	Sürüntü
155	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	57	Beyin Cerrahi yoğun bakım	Trakeal Aspirasyon
156	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	19	Dermatoloji Polikliniği	Püy
157	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	78	Dahiliye Nefroloji Servisi	Balgam
158	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	19	Yanık Ünitesi	Sürüntü
159	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	62	Yanık Ünitesi	Sürüntü
160	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	0	Çocuk Yenidoğan YoğunBakım 2	Trakeal Aspirasyon
161	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	53	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
162	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	53	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
163	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	52	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Periton Mayı
164	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	6	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
165	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	63	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
166	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	33	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Periton Mayı
167	H.M.K.Ü.T.F.H.	K	86	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Kan
168	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	62	Yanık Ünitesi	Sürüntü
169	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	37	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Trakeal Aspirasyon
170	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	1	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirasyon
171	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	46	Dahiliye Yoğun Bakım-2	Kan
172	H.M.K.Ü.T.F.H.	E	62	Yanık Ünitesi	Sürüntü

Cinsiyet açısından çalışmaya dahil edilen örneklerin 114`ünün Erkek bireylerden 58`inin ise Kadın bireylerden oluştuğu görülmüştür. Erkeklerin ortalama yaşı 38.4 iken, kadınlarda ortalama yaşı 37.75 olduğu, çalışmaya katılan tüm hastaların ortalama yaşının ise 38.1 olduğu belirlenmiştir.

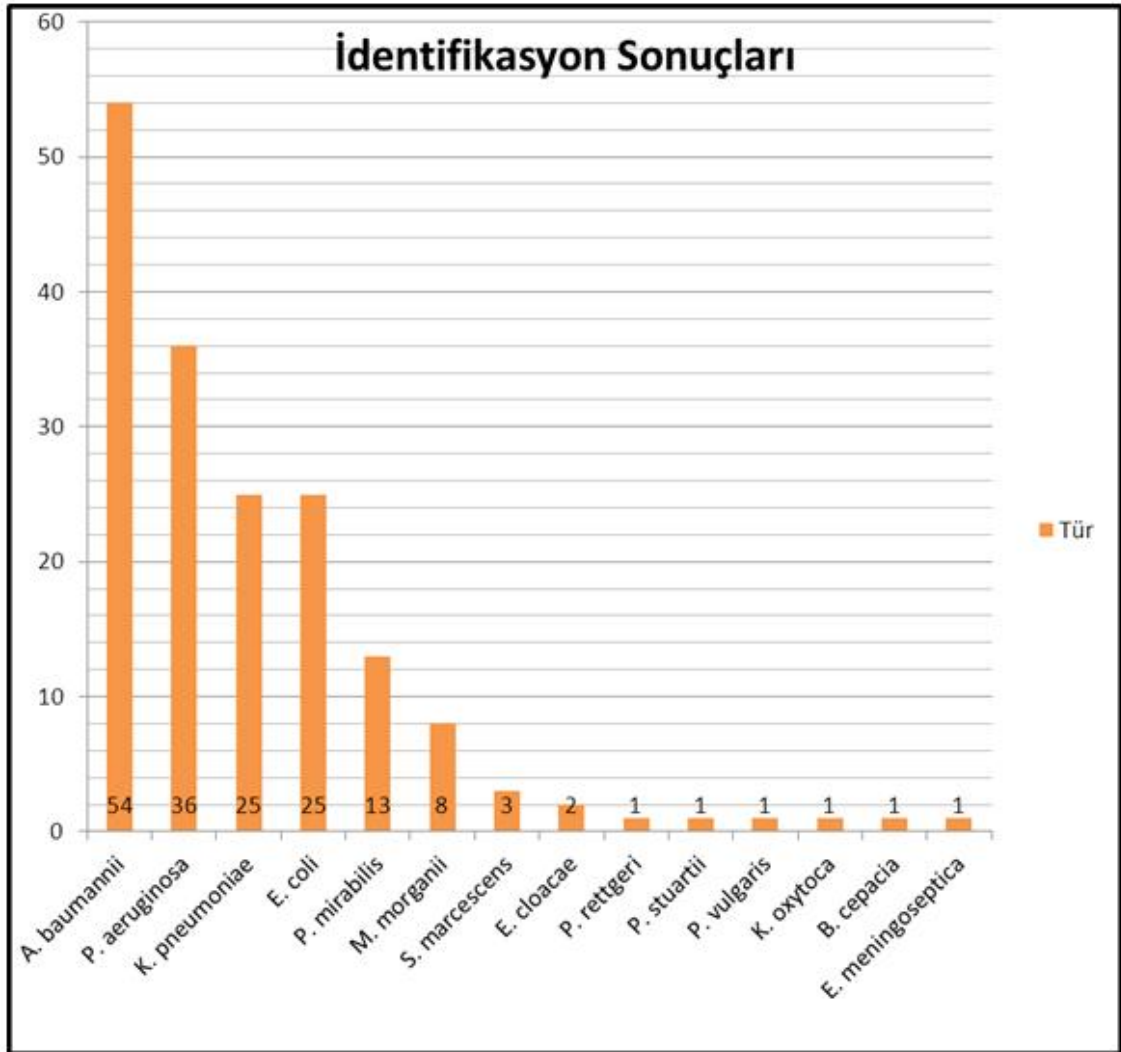
Çalışmaya çeşitli servis, klinik ve polikliniklerdeki hastalardan ve çeşitli materyallerden izole edilen izolatlar dahil edilmiştir. Bu çalışma 45 trakeal aspirasyon, 40 Kan, 25 sürüntü, 25 idrar, 8 Püy, 8 Balgam, 8 Vajen sürüntüsü, 5 Periton mayi, 3 Abse, 2 Burun sürüntüsü, 1 Boğaz sürüntüsü, 1 BOS, 1 Serviks Sürüntüsü ve 1 Korneamateryallerinden oluşmuştur (Şekil 22).



Şekil 22. Klinik materyallerin dağılımını gösteren şema.

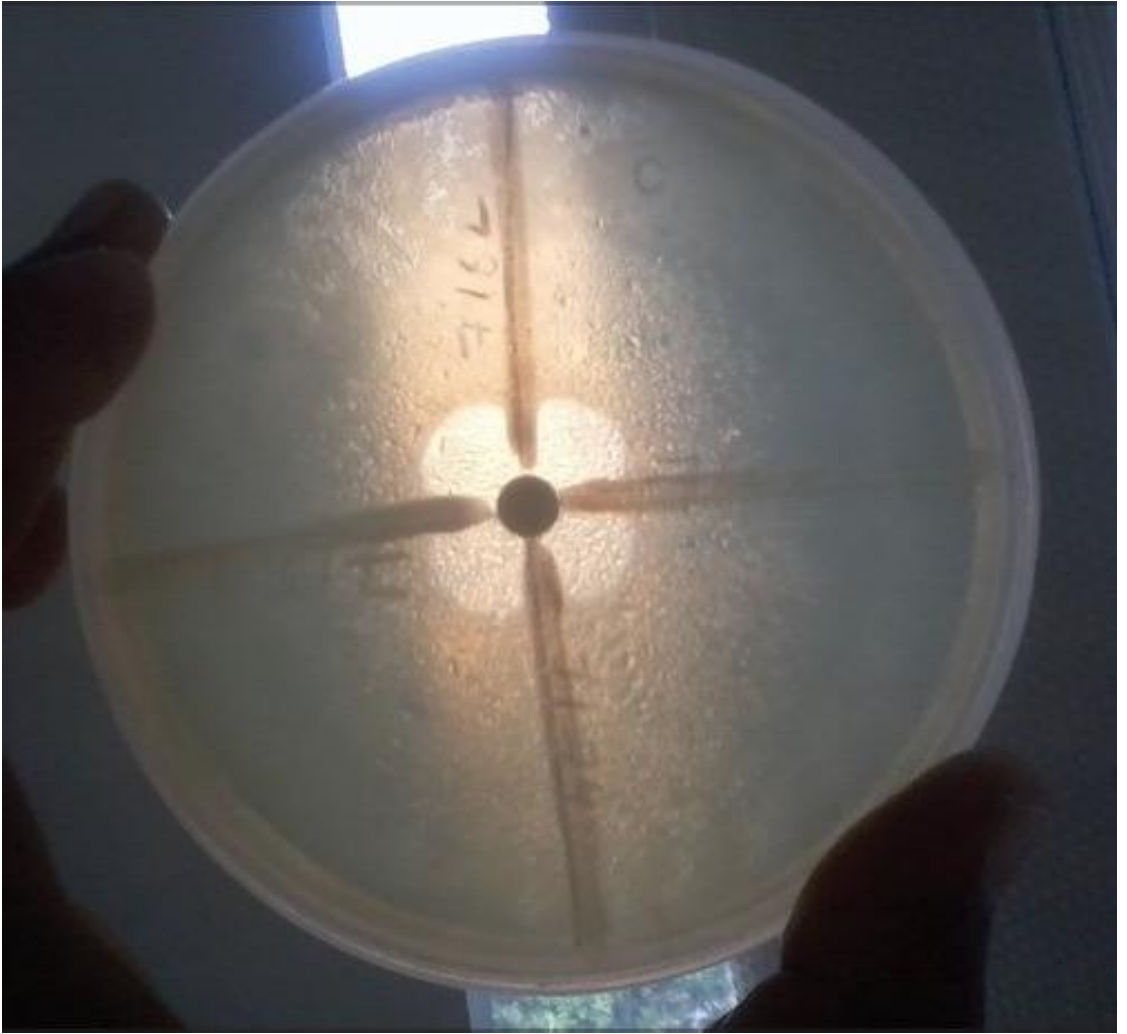
İzolaların tanımlanması amacıyla merkezlerden bölüm laboratuvarlarımıza transorte edilen karbapenem dirençli gram negatif basil ön tanıli örnekler, tanının doğrulanması amacıyla çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlere tabii tutulmuştur. Bu amaçla örnekler gram boyama, çeşitli besiyerlerinde kültür testleri, katalaz testi, oksidaz testi, IMVIC testleri ve BD-CRYSTAL® Enteric/ Non-fermenter İdentifikasyon Testi ile değerlendirilmiştir.

Yapılan tür tanımlama işlemleri sonrası klinik örneklerde üreyen mikroorganizma türleri ve sayıları 54 *A. baumannii*, 36 *P. aeruginosa*, 25 *K.neumoniae*, 25 *E. coli*, 13 *P. mirabilis*, 8 *Morganella morganii*, 3 *S. marcescens*, 2 *E. cloacae* ve 1'er *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Elizabethkingia meningoseptica* şeklinde oluşmuştur.



Şekil 23. Bölüm laboratuvarımızda yapılan identifikasyon çalışmaları sonucu merkezlerden gelen örneklerin tür dağılımını gösteren şema.

Tür tanımlama işlemlerinden sonra karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla Modifiye Hodge testi yapılmıştır. Merkezlerden bölümümüze karbapenem dirençli gram negatif basil ön tanısı ile gelen 172 izolatın yapılan Modifiye Hodge testi sonucu 168 tanesi karbapenem dirençli bulunmuştur. 172 izolattan 168'ini karbapenem dirençli olarak tanımlayan Modifiye Hodge testinin VITEKII ile karşılaştırıldığında sensitivitesi 97.6 olarak değerlendirilmiştir. Genotipik çalışmalara Modifiye Hodge Testi karbapenem direnci açısından altın standart kabul edildiğinden Modifiye Hodge Testinde pozitif olduğu belirlenen izolatlar dahil edildi.



Şekil 24. Dört Modifiye Hodge Testi pozitif izolatın oluşturduğu yonca yaprağı görünümü.

Modifiye Hodge testi ile fenotipik olarak karbapenem sentezlediği doğrulanamayan 4 izolatın (*A. baumannii*) çıkarılması sonucu genotipik çalışmalara dahil edilecek yeni türlerin dağılımı 50*A. baumannii*, 36 *P. aeruginosa*, 25 *K. pneumoniae*, 25*E. coli*, 13 *P. mirabilis*, 8 *Morganella morganii*, 3 *S. marcescens*, 2 *E. cloacae* ve 1'er *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Elizabethkingia meningoseptica* şeklinde oluşmuştur.

Suşların çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi için CLSI önerilerine göre Kirby-Bauer Disk Difüzyon testi yapılmıştır. Test edilecek antibiyotikler seçilirken klinikte kullanıma rehber niteliğinde olabilecek şekilde her antibiyotik grubundan en az bir temsilci olmasına dikkat edildi. Penisilinlerden Ampisilin, B-laktam+betalaktamaz kombinasyonlarından Ampisilin+Sulbaktam, Amoksisilin+Klavulanat, Piperasilin+Tazobaktam, Sefalosporinlerden Sefotaksim, Sefoksitin, Sefepim, Monobaktam olarak Aztreonam, Karbapenemlerden Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Aminoglikozidlerden Gentamisin, Tetrasiklinlerden Tetrasiklin, Florokinolonlardan Siprofloksasin ve Folat yolu antagonistlerinden Trimetoprim+Sulfometaksazol antibiyotiklerine karşı izolatların duyarlılık hesapları yapıldı. Kirby-Bauer Disk Difüzyon antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonucu elde edilen zon çaplarının, CLSI kriterleri ile değerlendirilmesi sonucu çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları. (Duyarlı izolat sayısı (S), Orta Dirençli izolat sayısı (I), Dirençli izolat sayısı (R) olarak belirtilmiştir. Antibiyotik kısaltmalarının açıklamaları Gereç ve Yöntem kısmından görülebilir.)

		AM	SAM	AMC	TPZ	CTX	FOX	FEP	ATM	ETP	IPM	MEM	CN	TE	CIP	SXT	CL
1	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
2	<i>A. baumannii</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
3	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
4	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
5	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
6	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S
7	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
8	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
9	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	I
10	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
11	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S
12	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
13	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
14	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
15	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
16	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
17	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
18	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
19	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
20	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
21	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
22	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
23	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
24	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
25	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
26	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	<i>A. baumannii</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
28	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
29	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
30	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
31	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S
32	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
33	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
34	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
35	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
36	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S
37	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
38	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
39	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
40	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
41	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
42	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
43	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
44	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S

45	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
46	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
47	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
48	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
49	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	I
50	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
51	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
52	<i>A. baumannii</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
53	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
54	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
55	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
56	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
57	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
58	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
59	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
60	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
61	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
62	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
63	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
64	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
65	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
66	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
67	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
68	<i>P. aeruginosa</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
69	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
70	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
71	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
72	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R
73	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
74	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
75	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
76	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
77	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S
78	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
79	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
80	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
81	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
82	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I
83	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
84	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
85	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
86	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
87	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
88	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
89	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
90	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
91	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
92	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
93	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S

94	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
95	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
96	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
97	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
98	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
99	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
100	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
101	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
102	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
103	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
104	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
105	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
106	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
107	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
108	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
109	<i>K. pneumoniae</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
110	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
111	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
112	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
113	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S
114	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
115	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
116	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
117	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
118	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R
119	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
120	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
121	<i>E. coli</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
122	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
123	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
124	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
125	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
126	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
127	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
128	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
129	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R
130	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R
131	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
132	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
133	<i>E. coli</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S
134	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	S
135	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	S
136	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S
137	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
138	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
139	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
140	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
141	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
142	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S

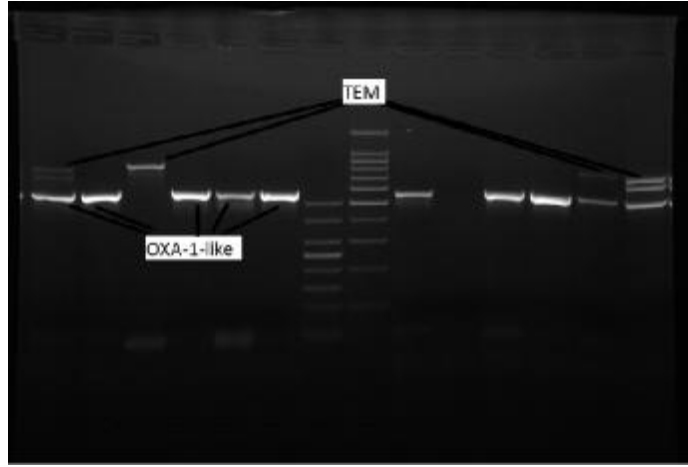
143	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
144	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
145	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
146	<i>P. mirabilis</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
147	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
148	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
149	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
150	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S
151	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
152	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
153	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
154	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
155	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
156	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
157	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
158	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
159	<i>M. morganii</i>	R	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S
160	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
161	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	I	R	S	S	R	S
162	<i>S. marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
163	<i>S. marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S
164	<i>S. marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
165	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
166	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
167	<i>P. rettgeri</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S
168	<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S
169	<i>P. vulgaris</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
170	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
171	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R
172	<i>E. meningoseptica</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I	R

Tablo 11. Kirby-Bauer Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının özeti ve direnç yüzdeleri.

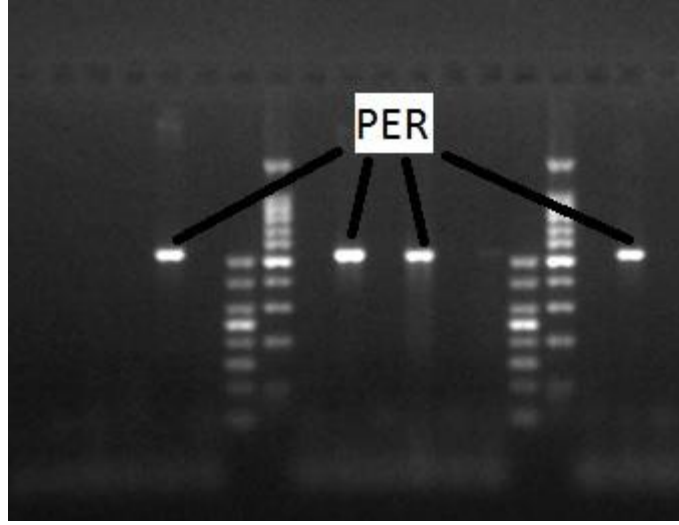
	AM	SAM	AMC	TPZ	CTX	FOX	FEP	ATM	ETP	IPM	MEM	CN	TE	CIP	SXT	CL
Duyarlı izolat sayısı (S)	0	8	0	0	0	7	27	53	0	7	15	68	65	74	8	168
Orta Dirençli izolat sayısı (I)	0	0	7	15	0	21	7	0	7	23	42	7	0	1	22	3
Dirençli izolat sayısı (R)	172	164	165	157	172	144	138	119	165	142	115	97	107	97	142	9
Direnç yüzdesi	%100	%95.3	%95.9	%91.2	%100	%83.7	%80.2	%69.1	%95.9	%82.5	%66.8	%56.3	%62.2	%56.3	%82.5	%5.2

Fenotipik çalışmaların ardından karbapenemaz genlerinin karakterizasyonu için genotipik çalışmalara geçilmiş, bu amaçla sıklıkla görülen β -laktamaz genlerini hedefleyen Multiplex-PCR metoduyla amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tespit edilen metallo beta laktamaz genleri amplifiye edilerek dizi analizleri yapılarak sub-tip düzeyinde tanımlanmıştır. Multiplex-PCR sonuçları Tablo 12`de verilmiştir.

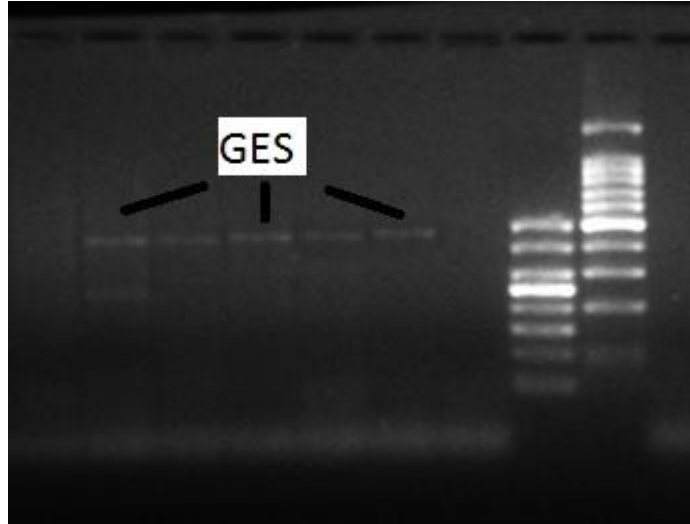
Multiplex-PCR sonrası görülen A,B ve D grubu karbapenemaz enzimleri daha spesifik ve tüm gen bölgesini amplifiye edebilecek primerlerle tekrar amplifikasyona sokulmuş ve dizi analizi yapılmıştır. Türler içerisinde β -laktamaz gen profilleri ve dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri Tablo 13`de verilmiştir.



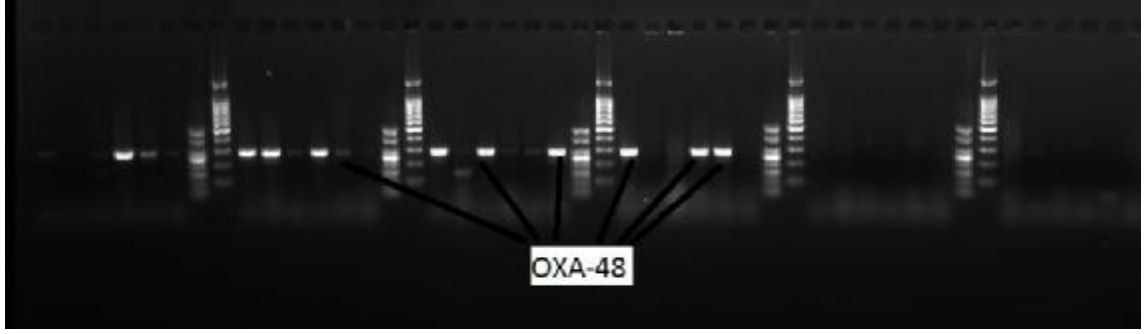
Şekil 25. *Acinetobacter* kökenlerine ait 564bp`lik OXA-1-like ve 800 bp`lik TEM genlerine özgü bant profillerini gösteren jel görüntüsü. 1.,11. ve 12. Sırada OXA-1-like ve TEM genlerini birarada bulunduran izolatlar, 3. sırada yalnız TEM genini bulunduran izolat ve diğer kuyucuklardada OXA-1-like genini bulunduran izolatlar görülmektedir. Orta sırada sol tarafta 50bp sağ tarafta ise 100bp`lik marker bulunmaktadır.



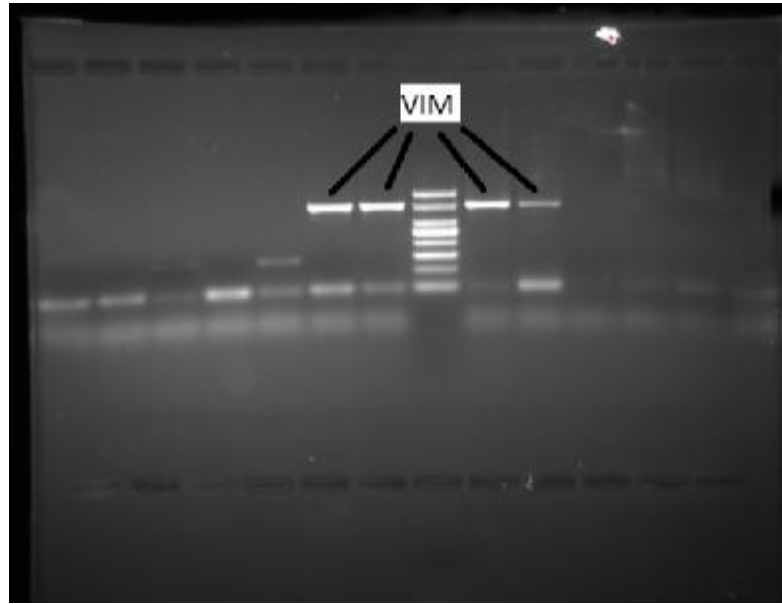
Şekil 26. *Pseudomonas* kökenlerine ait 520 bp`lik PER genlerine özgü bant profillerini gösteren jel görüntüsü. Orta sıralarda sol tarafta 50bp sağ tarafta ise 100bp`lik marker bulunmaktadır.



Şekil 27. *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* kökenlerinde belirlenen 399 bp`lik GES enzimine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü. Sağ tarafta solda 50bp sağ tarafta ise 100bp`lik marker bulunmaktadır.



Şekil 28. Çeşitli kökenlere ait 281 bp'lik OXA-48 geninin bant profillerini gösteren jel görüntüsü. Örnekler arasında solda 50bp sağ tarafta ise 100bp'lik markerlar bulunmaktadır.



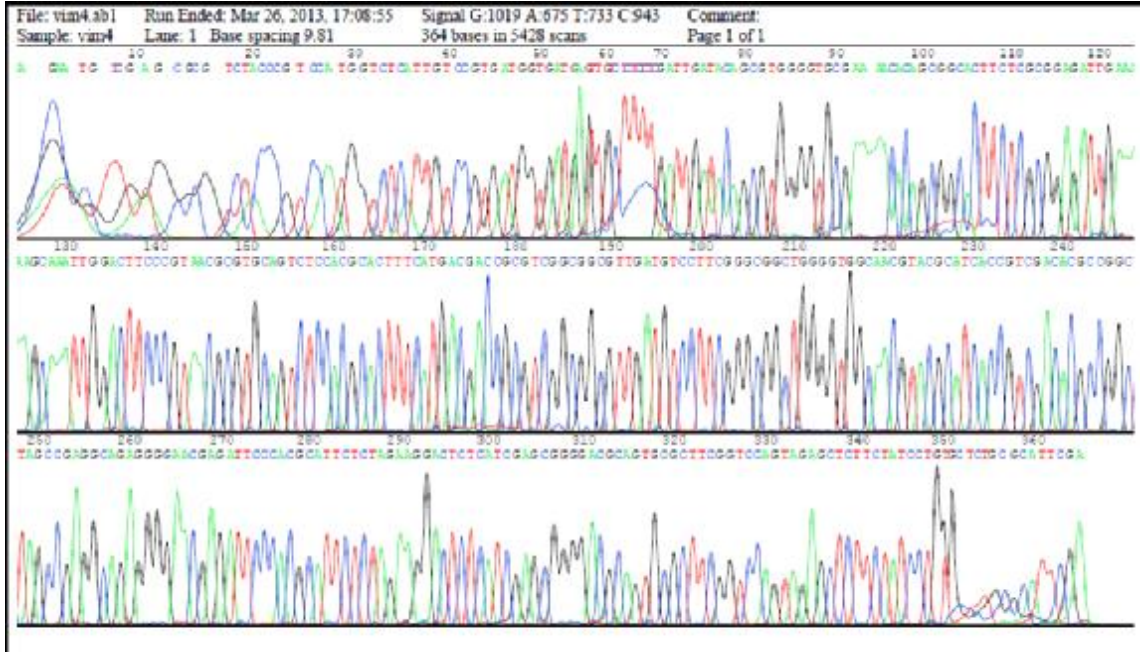
Şekil 29. Sol tarafta *E. cloacae* sağ tarafta ise *P. aeruginosa* kökenlerinde tespit edilen 390 bp'lik VIM geninin bant profilini gösteren jel görüntüsü. Örneklerin ortasında 50 bp'lik marker bulunmaktadır.

Tablo 12. Multiplex-PCR sonucu kökenlerde amplifiye edilen β-laktamaz genlerini gösteren tablo.

Kod	Tür	B-laktamazlar	Kod	Tür	B-laktamazlar	Kod	Tür	B-laktamazlar	Kod	Tür	B-laktamazlar
1	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	57	<i>P. aeruginosa</i>	PER	113	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	169	<i>P. vulgaris</i>	OXA-48
2	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	58	<i>P. aeruginosa</i>	-	114	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	170	<i>K. oxytoca</i>	CTX-M+OXA-1-like
3	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	59	<i>P. aeruginosa</i>	IMP	115	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	171	<i>B. cepacia</i>	-
4	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	60	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	116	<i>E. coli</i>	CTX-M+NDM	172	<i>E. meningoseptica</i>	-
5	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	61	<i>P. aeruginosa</i>	-	117	<i>E. coli</i>	OXA-48			
6	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	62	<i>P. aeruginosa</i>	IMP	118	<i>E. coli</i>	OXA-48			
7	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	63	<i>P. aeruginosa</i>	-	119	<i>E. coli</i>	OXA-48			
8	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	64	<i>P. aeruginosa</i>	IMP	120	<i>E. coli</i>	OXA-48			
9	<i>A. baumannii</i>	-	65	<i>P. aeruginosa</i>	PER	121	<i>E. coli</i>	CTX-M			
10	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	66	<i>P. aeruginosa</i>	-	122	<i>E. coli</i>	CTX-M			
11	<i>A. baumannii</i>	OXA-1-like+TEM	67	<i>P. aeruginosa</i>	GES+OXA-1-like	123	<i>E. coli</i>	OXA-48			
12	<i>A. baumannii</i>	-	68	<i>P. aeruginosa</i>	GES	124	<i>E. coli</i>	OXA-48			
13	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	69	<i>P. aeruginosa</i>	-	125	<i>E. coli</i>	OXA-48			
14	<i>A. baumannii</i>	OXA-1-like+TEM	70	<i>P. aeruginosa</i>	VIM	126	<i>E. coli</i>	OXA-48			
15	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	71	<i>P. aeruginosa</i>	-	127	<i>E. coli</i>	OXA-48			
16	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	72	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	128	<i>E. coli</i>	CTX-M			
17	<i>A. baumannii</i>	-	73	<i>P. aeruginosa</i>	VIM	129	<i>E. coli</i>	OXA-48			
18	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	74	<i>P. aeruginosa</i>	PER	130	<i>E. coli</i>	OXA-48			
19	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	75	<i>P. aeruginosa</i>	-	131	<i>E. coli</i>	OXA-48			
20	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	76	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	132	<i>E. coli</i>	OXA-48			
21	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	77	<i>P. aeruginosa</i>	-	133	<i>E. coli</i>	OXA-48			
22	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	78	<i>P. aeruginosa</i>	-	134	<i>E. coli</i>	OXA-48			
23	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	79	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	135	<i>E. coli</i>	OXA-48			
24	<i>A. baumannii</i>	-	80	<i>P. aeruginosa</i>	GES	136	<i>E. coli</i>	OXA-48			
25	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	81	<i>P. aeruginosa</i>	PER	137	<i>E. coli</i>	OXA-48			
26	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	82	<i>P. aeruginosa</i>	-	138	<i>E. coli</i>	OXA-48			
27	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	83	<i>P. aeruginosa</i>	PER	139	<i>E. coli</i>	OXA-48			
28	<i>A. baumannii</i>	OXA-1-like+FOX	84	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	140	<i>E. coli</i>	OXA-48			
29	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	85	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	141	<i>P. mirabilis</i>	-			
30	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	86	<i>P. aeruginosa</i>	-	142	<i>P. mirabilis</i>	-			
31	<i>A. baumannii</i>	GES	87	<i>P. aeruginosa</i>	-	143	<i>P. mirabilis</i>	NDM			
32	<i>A. baumannii</i>	-	88	<i>P. aeruginosa</i>	-	144	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
33	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	89	<i>P. aeruginosa</i>	-	145	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
34	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	90	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-48	146	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
35	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	91	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	147	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
36	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	92	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	148	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
37	<i>A. baumannii</i>	-	93	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	149	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
38	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	94	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+NDM	150	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
39	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	95	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	151	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
40	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	96	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	152	<i>P. mirabilis</i>	-			
41	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	97	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	153	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M			
42	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	98	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	154	<i>M. organii</i>	CTX-M			
43	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	99	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	155	<i>M. organii</i>	CTX-M			
44	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	100	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	156	<i>M. organii</i>	-			
45	<i>A. baumannii</i>	GES	101	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	157	<i>M. organii</i>	-			
46	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	102	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	158	<i>M. organii</i>	-			
47	<i>A. baumannii</i>	-	103	<i>K. pneumoniae</i>	IMP	159	<i>M. organii</i>	-			
48	<i>A. baumannii</i>	-	104	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	160	<i>M. organii</i>	CTX-M			
49	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+ACC	105	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	161	<i>M. organii</i>	CTX-M			
50	<i>A. baumannii</i>	OXA-1-like	106	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	162	<i>S. marcescens</i>	CTX-M			
51	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	107	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	163	<i>S. marcescens</i>	-			
52	<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like+TEM	108	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	164	<i>S. marcescens</i>	-			
53	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	109	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M	165	<i>E. cloacae</i>	VIM			
54	<i>A. baumannii</i>	OXA-58	110	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	166	<i>E. cloacae</i>	VIM			
55	<i>P. aeruginosa</i>	PER	111	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	167	<i>P. rettgeri</i>	-			
56	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-23+ACC	112	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	168	<i>P. stuartii</i>	-			

Tablo 13. Kökenlerde görülen β -laktamaz enzim profilleri ve Dizi analizi yapılan karbapenemaz genlerinin sub-tip sonuçlarını gösteren tablo.

<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like	OXA-58	OXA-23-like+TEM	OXA-1-like+TEM	OXA-1-like+FOX	GES	OXA-23-like+ACC
İzolot sayısı	14	18	7	2	1	2	1
Yüzde%	25.9	33.3	12.9	3.7	1.85	3.7	1.85
Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri		18*OXA-58				2*GES-11	
<i>P. aeruginosa</i>	PER	OXA-23+ACC	IMP	OXA-48	GES+OXA-1-like	GES	VIM
İzolot sayısı	6	1	3	7	1	2	2
Yüzde%	27.2	2.7	8.3	19.4	2.7	5.5	5.5
Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri	6*PER-1		3*IMP-1	7*Dizi analizi yapılamadı	1*GES-11	1*GES-11+1*GES-12	1*VIM-5+1*VIM-7
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+NDM	NDM	OXA-48	CTX-M	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M	NDM
İzolot sayısı	1	3	14	7	İzolot sayısı	9	1
Yüzde%	4	12	56	28	Yüzde%	69.2	7.6
Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri	1*NDM-1	3*NDM-1	2*OXA-48		Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri		Dizi analizi yapılamadı
<i>E. coli</i>	CTX-M+NDM	CTX-M	OXA-48	<i>E. cloacae</i>	VIM	<i>P. vulgaris</i>	OXA-48
İzolot sayısı	1	4	21	İzolot sayısı	2	İzolot sayısı	1
Yüzde%	0.4	16	84	Yüzde%	100	Yüzde%	100
Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri	Dizi analizi yapılamadı		21*OXA-48	Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri	2*VIM-5	Dizi analizi yapılan genlerin sub-tipleri	1*OXA-48



5. TARTIŞMA

Gram negatif basil grubundaki bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların neredeyse hepsinde β -laktam grubu antibiyotikler tedavinin ilk seçeneğini oluşturmaktadır. Ancak son birkaç dekatta bu bakteri grubunda diğer çoğu bakterilerde olduğu gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişimi söz konusudur. 1970-80 yılları arasında tanımlanan direnç olgusu daha sonraları gerek mekanizmalar gerekse kaynakları açısından günümüze kadar irdelenmiş ve bu alanda pek çok bilgi edinilmiştir. Özellikle gram negatif basillerde görülen β -laktam direnci en çok çalışılan ve en çok ilerleme kaydedilen alandır. Nitekim β -laktam direncine yol açan mekanizmaların çoğu açıklığa kavuşturulmuş, hücre duvarı modifikasyonlarına ek olarak en önemli direnç mekanizmasının enzimatik direnç olduğu açıklığa kavuşturulmuştur. B-laktam antibiyotiklere karşı direnç gösteren bu enzimlere β -laktamaz denilmektedir. Yıllar içerisinde β -laktamazlar tek bir ilaca karşı direnç gösteren enzimler olmaktan çıkmış, geçirdikleri mutasyon ve modifikasyonlarla direnç spektrumlarını geliştirmişler ve Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar ortaya çıkmıştır. İnsanoğlu bakterilere karşı verdiği bu savaşta son yıllarda yeni β -laktam antibiyotikler geliştirmeye devam etmiş ve son silah olarak karbapenem grubu geniş spektrumlu antibiyotikler geliştirilmiştir. Bakteriler ise karbapenemaz denilen yeni β -laktamaz enzimleri geliştirerek bu savaşı devam ettirmeyi başarmış hatta öne geçmiş duruma gelmiştir.

Günümüzde karbapenemaz enzimleri 200'den fazla subtip ile temsil edilmekte ve bu enzimler tüm dünyaya yayılmış bir şekilde toplumu tehdit etmektedir. Yaşanan tecrübeler göz önüne alınırsa karbapenemaz tipi G.S.B.L. üreten gram negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı en gerçekçi strateji, hızla yeni etkili antibiyotik veya antibiyotik kombinasyonları geliştirmek olmamalıdır. Nitekim G.S.B.L. üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlarda kinolon, karbapenem gibi yeni antibiyotiklerin yoğun kullanılması kısa sürede gelişen dirence bağlı olarak bu endikasyonda yeni geliştirilen antibiyotiklerinde kaybedilmesi ile sonlanmıştır. Temel strateji, bu suşların toplum ve hastane içerisindeki hareketlerini izleyecek genotip düzeyinde hızlı sonuç veren moleküler epidemiyolojik metodların geliştirilmesi, hızlı duyarlılık testlerinin yardımı ile dirençli suşların hareket alanının sınırlandırılması ve yeni direnç gelişiminin minimize edilmesi üzerine

kurulmalıdır. Mevcut klasik mikrobiyolojik tanı protokolleri ile karbapenemaz üreten gram negatif bakterilerin izlenmesi son derece zordur. Diğer taraftan antibiyotiklerin kullanım sıklıkları ve tercih edilen jenerasyonlar arasındaki ülkeler arası farklılıklar karbapenemaz tiplerinin ve görülme sıklıklarının bölgeler arası farklılıklar göstermesine sebep olmuştur. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda elde edilen prevalans sonuçları dışında bir önemli bulguda gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere bir çok ülkede gerek hastane gerekse toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilen gram negatif basil tanılı suşlar arasında karbapenemaz enzimi üreten suşların prevalansındaki büyük artıştır. Bu çalışmalarda örneğin NDM-1 tipi karbapenemaz üreten bazı spesifik suşların klonal yayılımı epidemiler oluşturabilecekleri, bu sebeple de mobil elementlerle beklenen yayılıma, klonal yayılımında eklenerek kısa sürede daha prevalan hale gelerek pandemi oluşturabilecekleri speküle edilmiştir. Çok sayıda olmamakla beraber benzer moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar bu spekülasyonun büyük ölçüde gerçekleri yansıttığını, karbapenemaz üreten gram negatif bakterilerin Enfeksiyon Hastalıkları uzmanları ve Mikrobiyologların global ve ortak problemi olduğunu göstermiştir. Biz çalışmamızı bu literatür bilgileri üzerine kurarak, hem mevcut durumu tespit etmek hem de daha sonra yapılacak çalışmalara ve kliniğe ışık tutması için, bölgemizde karbapenemaz üreten gram negatif basillerde hem bilinen G.S.B.L.'ler hemde karbapenemaz enzim tiplerini subtip düzeyinde belirleyerek yerel verilerimizi literatür verileri ile kıyaslamayı amaçladık.

Çalışmamızda tür tanımlama işlemlerinden sonra dahil edilen izolatlarda karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla yapılan MHT'nin VITEK II sistemiyle karşılaştırıldığında sensitivitesinin % 97.6 olduğu görülmüştür.

VITEK II sistemi daha çok rutin laboratuvarlarda hızlı identifikasyon amacıyla kullanılan ve son geliştirmelerle direnç analizleride yapabilen bir sistemdir ancak karbapenem direnci konusunda VITEK II sisteminin çok fazla yanlış pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir¹⁶⁸. Bunun yanında bazı enterik bakteri türlerinde imipenem ve meropenem karşı yanlış duyarlılık dereceleri verdiği de gösterilmiştir^{169, 170}. Genellikle kabul görmüş olan doğru bir hastada karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık belirlendiğinde karbapenem direncinin mümkünse ilk önce hızlı moleküler testlerle doğrulanması eğer bu mümkün değilse MHT, APB, (3-aminophenylboronic acid)-Meropenem kombine disk, Dipikolinik asit- Meropenem kombine disk veya Imipenem-

EDTA kombine disk testlerinin en az ikisinde birden karbapenem direncinin gösterildikten sonra izolatu karbapenem dirençli kabul etmektedir¹⁷¹. MHT ise %95-100 gibi yüksek sensitivite oranlarına sahip ancak uygulama zorluğu ve bazı minör karbapenemaz genlerini kaçırabilme gibi dezavantajlara sahip bir fenotipik testtir bunun yanında bazı CTX-M veya AmpC tipi β -laktamaz sentezleyebilen izolatlarda azalmış veya kaybedilmiş porin ekspresyonu nedeniyle MHT spesifite oranlarını yanlış pozitif sonuçlarla düşürebilmektedir¹⁷¹. Nordmann ve Poirel karbapenem direncinin belirlenmesi üzerine yaptıkları yoğun araştırmalar sonucu 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında kendi geliştirdikleri Carba NP ve SUPERCARBA testlerinin MHT'nin dezavantajlarını ortadan kaldırdığını ve rutinde bu testlerin kullanılmasını önermişlerdir¹⁷².

Bizim çalışmamızda MHT ile, VITEK II sistemiyle karbapenem dirençli olarak identifiye edilen 4 izolatta karbapenem direnci belirlenmemiştir. Bu sonuç literatürde sıkça anılan VITEK II sisteminin yanlış pozitif sonuçlar verebileceği bilgisiyle örtüşmektedir. Bizim önerimiz VITEK II sisteminin hızlı identifikasyon amacıyla rutin laboratuvarlarda kullanmaya uygun olduğu ancak mutlaka bir moleküler test yada en az iki fenotipik test ile doğrulanmasının rutine sokulmasıdır.

Karbapeneme dirençli olduğu belirlenen izolatlar arasında çeşitli antibiyotiklere karşı yaptığımız duyarlılık testi sonuçlarına göre penisilin, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları, sefalosporinler, ertapenem, imipenem ve trimetoprim/sülfametaksazole karşı %80 üzeri yüksek direnç oranları belirlenmiş, sadece aztreonam (%69.1), meropenem (%66.8), gentamisin (%56.3), tetrasiklin (%62.2), florokinolon (%56.3) tipi antibiyotiklere karşı daha düşük boyutlarda direnç gözlenmiştir. Kolistine ise %5.2 düzeyinde direnç görülmüştür.

10 yıllık bir surveyans çalışması yapan Yang ve ark. 23 merkezde hem toplum kökenli hemde nozokomiyal kökenli 3074 *E. coli*, 1025 *K. pneumoniae* izolatında çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık testleri yapmış, ertapenem, imipenem, amikasin ve piperasilin/tazobaktam'ın 10 yıl boyunca yüksek bir aktivite gösterdiğini ancak *E. coli* izolatlarında 10 yıl süresince sefalosporinlere, florokinolonlara ve ampisilin/sulbaktama karşı direncin dramatik bir şekilde arttığını bu veriler yanında çalıştıkları izolatlar arasında GSBL sentezleme oranının 2002-2003 yıllarında %19.1 iken 2010-2011 yıllarında bu oranın %66.6'ya yükseldiğini bildirmişlerdir¹⁷³. Coğrafik olarak bize yakın

bir ülke olan Yunanistan`dan Falagas ve ark.`nın 2010 tarihli çalışmasında ise MDR (Multi Drug Resistant) ve XDR (Extremely Drug resistant) *Enterobacteriaceae* izolatlarıyla antibiyotik duyarlılığını araştırdıkları çalışmada en az 3 antibiyotik grubuna dirençli izolatları MDR, bir veya iki grup hariç diğer tüm antibiyotik gruplarına dirençli izolatları ise XDR olarak sınıflandırmış, MDR izolatları karşı en etkili antibiyotikleri duyarlılık oranları sırasıyla Fosfomisin (%92.8), Tigesiklin (%92.1) ve kolistin (%73) olarak belirlemişler bunları imipenem (%35.5), tetrasiklin (%20.4), gentamisin (%19.7), trimetoprim/sülfametaksazol (%12.5) ve siprofloksasin (%10.5)`in izlediğini belirtmişlerdir<sup>174</sup>. 2009`da Lee ve ark.`nın Tayvan`da imipenem`e duyarlılığını kaybetmiş *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik duyarlılığı araştırdıkları çalışmada izolatların sadece Tigesiklin ve Kolistin`e anlamlı derecede hassas bulunduğunu bildirmişlerdir¹⁷⁵. Türkiye`de ise henüz karbapenem dirençli izolatların antibiyotik duyarlılıkları üzerine yapılmış geniş çaplı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu az sayıdaki çalışmalardan biri olan Ergin ve ark.`nın 2013 yılında yayınladıkları makalede İstanbul`daki MDR *A. baumannii* izolatları çalışılmış ve izolatlarının %98`inin Kolisitin`e, %94`ünün Tigesiklin`e hassas olduğunu bu antibiyotikleri ise sırasıyla %17, %17 ve %18 oranları ile Imipenem, meropenem ve doripenem`in izlediğini bildirmişlerdir¹⁶⁴. Bir başka yerel çalışmada ise Sarı ve ark. 2013 yılında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesindeki bir MDR *A. baumannii* salgınına belirlemiş ve çalışılan izolatların tümünün Seftazidim, Imipenem, Meropenem, Piperasilin/Tazobaktam, Siprofloksasin, Gentamisin, Tobramisin, Trimetoprim/Sülfametaksazol ve Sefaperazon/Sulbaktam antibiyotiklerine dirençli olduklarını bildirmişlerdir¹⁶⁰. Ankara`dan Kılıç ve ark.`nın 2011 yılında 7 aylık bir dönem sonunda 515 klinik *Enterobacteriaceae* izolatı arasından izole ettikleri 4 karbapenem dirençli suşta yaptıkları antibiyotik duyarlılık testleri sonucu izolatlarının Amikasin`e %100, Aztreonam`a %50, Sefepim`e %50, Siprofloksasin`e %50, Levofloksasin`e %50, Kolistin`e ve Polimiksin B`ye %75, Tetrasiklin`e %50, Tigesiklin`e %100 ve Trimetoprim/Sülfametaksazol`e %50 duyarlı olduklarını bildirmişlerdir¹⁵⁹.

Tüm bu sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde bizim sonuçlarımızın dünyadaki antibiyotik direnç profili ile uyumlu olduğu söylenebilir. Yang ve ark.`nın çalışmasına dahil edilen izolatların seçim kriterlerinde karbapenem dirençli olma özelliği aranmamış

olması bizim çalışmamızla kıyaslanabilirliğini azaltsada, gram negatif bakterilerde gözlenen direncin son 10 yılda ne kadar dramatik bir değişim gösterdiğini ve bu direnç artışında diğer mekanizmalardan çok esas dikkate alınması gerekenin G.S.B.L. enzimleriyle gelişen direnç olduğunu göstermesi açısından son derece açıklayıcıdır. Falagas ve ark.`ı çalışmasında Tigesiklin, Fosfomisin ve Kolistin`i MDR izolatlar karşı en etkili antibiyotikler olarak göstermesi bizim çalışmamızdaki Kolistin (direnç: %5.2) bulgularını aynı zamanda diğer test edilen tüm antibiyotiklere karşı düşük duyarlılık değerlerinin elde edilmiş olmasıda diğer antibiyotiklere karşı elde ettiğimiz duyarlılık bulgularımızı desteklemektedir. Bunun yanında karbapenem duyarlılığını kaybetmiş izolatlarda kolistinin verimli in-vitro aktivitesi bulgumuzu Lee ve ark`nın yaptığı çalışmada desteklemektedir. Ülkemizdeki çalışmalarla bulgularımız kıyaslandığında genel olarak 2011 tarihli Kılıç ve ark`nın çalışması ile uyumsuz olduğu söylenebilir ancak 2013 yılında Sarı ve ark.`nın yaptığı çalışmada test edilen ortak antibiyotikler baz alındığında bir uyum söz konusudur. Buna sebep olarak aradan geçen 2 yılda ülkemizin antibiyotik direnç profilinin değişmesi veya hastaneler ve/veya coğrafi farklılıklar olduğu düşünülebilir. Literatür verileri bizim verilerimizle birlikte yorumlandığında ortaya çıkan gerçek antibiyotik direncinin korkunç boyutlara ulaştığı ve bu direncin esas yüzünü gösterdiği alan olan kliniklerde hekimlerin kullanabileceği antibiyotik seçeneklerinin giderek daraldığıdır. Bu bağlamda her ülkede yapılacak epidemiyolojik sürveyans çalışmaları verileri dikkate alınarak acil önlem alınması ve geleceğe dair akılcı, disipline dayalı stratejiler geliştirilip uygulanması çözüm için azami gereklidir.

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

Çalışmamıza dahil edilen *A. baumannii* izolatlarında 18 izolatta OXA-58 (%33.3), 14 izolatta OXA-23-like (%25.9), 7 izolatta OXA-23-like+TEM (%12.9), 2 izolatta OXA-1-like+TEM (%3.7), 2 izolatta GES (%3.7), 1 izolatta OXA-1-like+FOX (%1.85) ve 1 izolatta OXA-23-like+ACC (%1.85) tipi β -laktamaz enzimleri identifiye edilmiştir. Bir non-fermenter gram negatif koko-basil olan *A. baumannii*'de çeşitli β -laktamazların varlığı gösterilmiş olmasına rağmen özellikle D sınıfı oksazilinazlarla

karakterizedirler ve bazen MBL`lar sentezleyen klonlarda bildirilir. Ülkemizde Ergin ve ark.`nın yaptığı geniş ölçekli araştırmada karbapenem direncine sebep olan genlerin %31 OXA-23-like, %23 OXA-58-like kalanlarında OXA-51-like olduğu, izolatların %54`ünde genlerin birarada aynı izolatta bulunduğunu bildirmişlerdir<sup>164</sup>. Ergin ve ark.`nın çalışmalarının bizim çalışmamızla pek çok benzer yanı olmasına rağmen tüm β -laktamaz genlerinin çalışılmamış olması ve dizi analizi ile identifikasyon yapılmamış olması farklılıklardır. Ergin ve ark.`nın %23`lük OXA-58-like oranı (hepsi OXA-58 kabul edilirse) bizim % 33.3`lük oranımıza yakın kabul edilebilir ancak bizim OXA-58 geninin OXA-23-like genine göre daha prevalan olduğunu gösteren bulgularımızın tersine söz konusu çalışmadaki yıllar içerisinde OXA-23-like genlerinin OXA-58-like genlerine göre daha prevalan hale geçtiği bulgusuyla farklıdır. Bu noktada Zarrilli ve ark. bu yıl yayımladığı güncel derleme yazısında tüm dünyadaki *A. baumannii* izolatları incelendiğinde bu yönde bir eğilim olduğunu bildirmişlerdir¹⁷⁶. Bizim çalışmamızdaki bir diğer ilginç bulgu 2 izolatta (%3.7) GES-11 tipi A grubu karbapenemazın tespit edilmesi idi. Ülkemizdeki ilk GES enzimini üreten izolat Belçika`ya transfer olmuş bir hastada Bogaerts ve ark. tarafından 2010 yılında gösterilmiştir<sup>161</sup>. Daha sonra 2013 yılında Cicek ve Zeka`nın grupları tarafından iki farklı araştırmada *A. baumannii* izolatları tarafından GES enzimi sentezlendiği bildirilmiştir^{162,163}. Bu çalışmalarda identifiye edilen GES enzimlerinin subtipleri GES-11 ve GES-12 idi. Bizim çalışmamızda izole ettiğimiz 2 GES-11 sentezleyen izolatla birlikte düşünüldüğünde ülkemizde GES enzimi sentezleyen *A. baumannii* izolatlarının varlığının göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmelidir. Çalışmamızdaki *A. baumannii* izolatlarının %18.6`sında  $\beta$ -laktamaz genlerinin kombine halde bulunduğu görülmüş ve bu kombinasyonların OXA-1-like veya OXA-23-like genlerine eşlik eden C sınıfı  $\beta$ -laktamazlar şeklinde olduğu görülmüştür. Zarrilli ve ark.`nın yazdıkları derlemede MDR veya XDR *A. baumannii* suşlarının gelişiminde mutlaka en az 2-3 mekanizma (β -laktamaz kombinasyonları veya diğer mutasyonlar) kombinasyonunun varlığının gerektiğini bildirmişlerdir¹⁷⁶. Bizim çalışmamızdaki *A. baumannii* izolatları düşünüldüğünde görülen yüksek direnç oranlarını sağlayan mekanizmalar ya aktivitesi yüksek karbapenemaz genleri yada kombine halde bulunan daha düşük aktiviteli β -laktamazlar sayesinde geliştiği yorumlanabilir ancak ileride karbapenemaz genlerinin

karakterizasyonu yanında porin proteinlerinin geçirgenliğine ve efflux sistemlerine yönelik çalışmalar yapılması bu mekanizmaların aydınlatılabilmesi açısından önemlidir.

Çalışmamıza dahil edilen bir başka non-fermentatif gram negatif basil morfolojisindeki tür *P. aeruginosa* idi. Bu türde identifiye edilen β -laktamaz genleri sayısı ve sırası ile şu şekilde idi: 6 izolatta PER-1, 3 izolatta IMP-1, 1 izolatta GES-11, 1 izolatta GES-12, 1 izolatta OXA-23-like+ACC, 1 izolatta VIM-5 ve 1 izolatta VIM-7 (7 izolatta OXA-48 geni Multiplex-PCR ile tespit edilmiş ancak dizi analizi yapılamadığından değerlendirme dışı tutulmuştur). Bu sonuçlar *P. aeruginosa* suşlarında β -laktamaz enzimlerinin karakteristik bir/birkaç gen yerine çeşitlilik gösterdiğini düşündürmektedir. Breidenstein ve ark. *P. aeruginosa*'daki direnç üzerine yaptıkları literatür derlemesinde bu mikroorganizmanın diğer gram negatif basillere göre antimikrobiyallere çok daha dirençli olmasının sebebini intrinsik olarak bulundukları azalmış dış membran geçirgenliği, gelişmiş efflux sistemleri, diğer bakterilerden farklı porin sayı ve yapıları gibi çeşitli direnç mekanizmalarına bağlamıştır¹⁷⁷. Örneğin *P. aeruginosa* hücre duvarı *E. coli*'ye göre 12-100 kat daha az geçirgen olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur¹⁷⁸. Fernandez ve ark. ise *P. aeruginosa*'yı bu yeteneklerinin yanı sıra antibiyotik baskısı, besin azlığı, yetersiz üreme ortamı gibi çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı diğer bakterilere göre daha iyi uyum sağlayabilen bir mikroorganizma olarak tanımlamıştır¹⁷⁹. Bu tür değişimler genomda bulunan *crc*, *lon*, *psrA*, *ampD*, *gyrA*, *nalA*, *nfxB*, *mexZ*, *phoQ* gibi genlerle kontrol edilmektedir¹⁷⁷. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda 36 *P. aeruginosa* izolatının 22'sinde β -laktamaz genlerinin identifiye edilmiş olmasının sebebi olarak, suşlarda görülen karbapenem direncinin mekanizmalarının enzimatik direnç dışındaki efflux sistemleri yada membran modifikasyonları olabileceği düşünülmüştür. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında 2012 yılında Atilla ve ark.'nın Samsundaki çalışmasında *P. aeruginosa* suşlarında PER-1 enzimi sıklığı %56.4, PER-2 ise %78.5 olarak bildirilmiştir¹⁸⁰. Yakupogulları ve ark. ise 2007 yılında PER-1 ve VIM-2 enzimlerini birarada sentezleyen bir suşu rapor etmişlerdir¹⁸¹. Erač ve ark.'nın PER enzimleri ile ilgili araştırmalarında ise *P. aeruginosa* suşlarında PER-1 prevelansının 2007 yılında %46.2 iken 2013 yılında %23.3 olduğu rapor edilmiştir^{182,183}. Bizim çalışmamızda izolatların %27.2'sinde PER-1 enzimi tanımlanmıştır. PER-1 enzimi ile ilgili prevelans bulgumuz ülkemizin diğer bölgelerine

göre düşüktür ancak güncel olan Eraç ve ark.`nın 2013 bulgularıyla benzerdir. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* suşlarında tespit edilen bir diğer önemli karbapenemaz 3 izolatta (%8.3) tanımlanan IMP-1 enzimidir. IMP enzimleri karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşları arasında çok yaygın olarak görülen bir MBL tipidir¹⁸⁴. Ülkemizde ilk olarak Aktas ve ark. tarafından 2006 yılında nöroblastomalı, 1 yaşındaki bir çocukta İstanbul'da bir *K. pneumoniae* suşundan izole edilen IMP-1 enzimi¹⁵³ eş zamanlı olarak çok uluslu bir antibiyotik direnci çalışma grubu olan SENTRY programının sonuçlarında bir *E. cloacae* suşunda tespit edilmiş¹⁵⁴, Özgümüş ve ark. ise 2007 yılında ilk kez *P. aeruginosa* suşlarında enzimi tanımlayarak prevalansı %9 olarak bildirmiştir¹⁸⁵. Özellikle uzak doğu ülkelerinde prevalan olan IMP elementlerinin ülkemizdeki çalışmalar değerlendirildiğinde 2006 yılından beri varlığını sürdürdüğü görülmektedir. Yapılan tek epidemiyolojik çalışma olan Özgümüş ve ark.`nın çalışması ile prevalans oranımız benzer olsada iki çalışma arasındaki fark dahil edilen izolatların bizim çalışmamızda karbapenem dirençli olmasıdır bu noktada IMP enzim prevalansının ülkemizde yıllar içerisinde baskınlığını azalttığı düşünülmüştür. Çalışmamızda tanımlanan bir diğer A sınıfı karbapenemaz olan GES enzimi 3 izolatta tanımlanmış subtip dağılımı 2 izolatta GES-11, 1 izolatta ise GES-12 şeklinde belirlenmiştir. GES-11 sentezleyen izolatların bir tanesinde OXA-1-like enzimi ile kombinasyon belirlendi. GES enzimleri daha önce ülkemizde birkaç çalışmada *A. baumannii* izolatlarında gösterilmiş¹⁶¹⁻¹⁶³, ancak *P. aeruginosa* suşları için yapılan literatür taramasında bir bulguya ulaşılamamıştır. Bizim çalışmamız ülkemizdeki *P. aeruginosa* izolatlarında GES enziminin varlığını gösteren ilk çalışmadır. Dünyadaki çalışmalara bakıldığında *P. aeruginosa* suşlarında GES enzimlerinin yaygın olduğu pek çok çalışmayla gösterilmiştir¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. Bizim çalışmamızdaki %8.2'lik oran ülkemizden başka çalışmalarla desteklenmemiş olmasına rağmen yeni bir bilgi olarak değerlendirilip GES enziminin tüm dünya gibi ülkemizde prevalan olduğu sonucuna varılabilir. Bir diğer MBL olan VIM enzimi ise ülkemizde ilk kez Bahar ve ark. tarafından 2004 yılında tanımlanmıştır (VIM-5). Dünyada IMP ile birlikte en sık *P. aeruginosa* türlerinde görülen MBL olan VIM enzimleri daha sonra 2008'de Yakupogullar ve ark. ve Poirel ve ark. tarafından gösterilmiş dolayısıyla bu enzimlerin varlığı ülkemizde bilinmektedir. Ancak ne kadar yaygın olduğuna dair bilgi literatürde eksiktir. Bizim çalışmamızda bu bilgi karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşları için

giderilmiş VIM enzimlerinin prevalansı %5.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda tanımlanan enzimlerden biri VIM-5 subtipinde iken diğer enzim VIM-7 olarak tanımlanmış ve ülkemizde tanımlanan ilk VIM-7 enzimidir. VIM-7 literatürde sadece A.B.D.`nde tanımlanmış ve bu bölgede yaygın olduğu bilinen bir sub-tiptir¹⁹⁰⁻¹⁹⁴. Bizim çalışmamızdaki VIM-7 sentezleyen izolat için ülkemizde ve bölgemizde daha önceki tanımlama olmaması uluslararası transfer olması ihtimalini akla getirmektedir. Nitekim direnç genlerinin yayılım mekanizmalarını derlemesinde ele alan Van der bij ve ark. turizmin ve uluslararası taşımacılığın bakteriyel direncin global yayılımındaki en büyük faktör olduğunu vurgulamışlardır¹⁹⁵. VIM-7 sentezleyen bu suşun ülkemizde eradikasyonamı? uğrayacağı yoksa persistemi? edeceği ileriki yıllarda yapılacak çalışmalarda belli olabilecektir.

Çalışmaya dahil edilen karbapenem dirençli 25 *K. pneumoniae* izolatlarının 14`ünde OXA-48 (%56), 7`sinde CTX-M (%28), 5`inde CTX-M+IMP-1 (%20), 3`ünde NDM-1 (12) ve 1`inde CTX-M+ NDM-1 genleri tanımlanmıştır. Toplum kökenli *K. pneumoniae* izolatlarında 2011 yılında yaptığımız bir çalışmada CTX-M genlerinin sıklığı % 88,8 olarak bulunmuştur¹⁹⁶. Bu yılki çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları arasındaki toplam CTX-M sıklığı ise %52 (13/25)`dir. Oluşan bu farkın sebebi muhtemel olarak çalışılan izolatların seçim kriterlerindeki farklılıklardır. Çalışmamızdaki *K. pneumoniae* izolatlarında en sık görülen β -laktamaz geni %56 oranıyla OXA-48 idi. Alp ve ark. 2013 yılında karbapenem dirençli 94 *K. pneumoniae* izolatlarında yaptıkları epidemiyolojik araştırmada OXA-48 gen prevalansının %91.5 olduğunu bildirmişlerdir¹⁹⁷. Nazik ve ark. ise 2011 yılında 22 izolatla yaptıkları çalışmada *K. pneumoniae* izolatları arasında OXA-48 gen prevalansının %100, 2012 yılındaki çalışmalarında ise 10 *K. pneumoniae* izolatının 8`inde (%80) OXA-48 geni bildirmişlerdir.<sup>158,198</sup>. Yine Kilic ve ark.`nın 2011 tarihli yayınında karbapenem direnci tespit edilen 3 *K. pneumoniae* izolatının 3`ündede OXA-48 genleri tespit edilmişti<sup>159</sup>. NDM-1 geni ise ülkemizde ilk kez 2012 yılında Poirel ve ark.`nın karakterizasyon çalışmasında gösterilmiş ve bu izolatın Irak`tan transport edilmiş bir hastadan İstanbul`da izole edildiği için NDM-1 sentezleyen kökenin ülkede persistans gerçekleştiremeyebileceği speküle edilmiştir¹⁹⁹. Ancak bu gelişmenin hemen arkasından gelen literatür bilgileri ile Türkiye`de NDM-1 enzimini taşıyan kökenlerin persiste ettiği ülkeler arasına girmiştir. Bu bilgi Alp ve ark.`nın *K. pneumoniae*`de %4.3`lük NDM-1

prevelansı bildirdiği çalışmasıyla literatüre girmiştir¹⁹⁷. Literatürdeki oranlar bize ülkemizdeki karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının neredeyse tamamında OXA-48 geninin varolduğunu NDM-1 geninin ise ülkemizde yeni yeni yayılmaya başladığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda ise OXA-48 gen prevelansı literatür verilerinde daha düşük bulunmuş, bu farklılığın sebebi olarak coğrafik farklılıklar ve CTX-M, NDM gibi diğer genlerin daha baskın olması düşünülmüştür. Nitekim bizim çalışmamızda 25 *K. pneumoniae* izolatının 4'ünde yani %16'sında NDM-1 geni belirlenmiştir. Ülkemizden NDM-1 varlığını bildiren çalışmaların simultane bir şekilde 2012-2013 yılları içerisinde yürütüldüğünü göz önünde bulundurduğumuzda, esasen Asya ve Orta Doğu coğrafyasında yaygın olan NDM-1 enziminin bizim çalışmamızdaki oranının daha yüksek çıkması Çukurova bölgesinin bölgedeki politik duruma bağlı olarak yoğun bir şekilde bu bölgelerden göç almasına bağlı bir sonuç olabilir.

Çalışmamızdaki *E. coli* izolatlarında ise, OXA-48 enzimlerinin karbapenem direncinin ana sorumlusu olduğu %84'lük oranla tespit edilirken bu enzimlere CTX-M enzimlerinin %16'lık oranla eşlik ettiği belirlendi. Bir izolatta multiplex-PCR'la NDM geni amplifiye edilmesine rağmen daha spesifik primerlerle dizi analizi amacıyla amplifikasyon gerçekleştirilememiş dolayısı ile bu sonuç yanlış pozitif kabul edilmiştir. Türkiye'de ilk kez bir *K. pneumoniae* izolatında 2001 yılında tanımlanan OXA-48 enzimi daha sonraki yıllarda çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinde ve *E. coli*'de gösterilmiştir^{159,200}. Türkiye OXA-48 enzimi için artık endemik kabul edilen bir ülkedir ve bu enzimi taşıyan kökenlerin artık toplum içerisinde sirkülasyona girdiği belirtilmektedir²⁰¹. Çalışmamızda *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına ek olarak birde *P. vulgaris* izolatında OXA-48 enzimi tanımlanmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında çalışma sonuçlarımızın OXA-48 ile ilgili literatür bilgilerini destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

Çalışmaya dahil edilen karbapenem dirençli diğer bakterilerde yapılan genotipik çalışmaların sonuçlarına bakıldığında; *P. mirabilis* suşlarında %69.2 oranında CTX-M, *M. Morganii* suşlarında %50 oranında CTX-M, *S. marcescens* suşlarında %33.3 oranında CTX-M, 2 *E. cloacae* suşunda VIM-5 ve 1 *K. oxytoca* suşunda CTX-M+OXA-1-like şeklinde dağılmıştır. VIM tipi MBL'lar daha çok non-fermenter gram negatif basillerde görülmesine rağmen literatürde şimdiye kadar yalnızca ülkemizde görülmüş bir subtiptir. Ülkemizde ilk olarak 2004 yılında Bahar ve ark. tarafından bir *P.*

aeruginosa suşunda tanımlanan VIM-5, daha sonra Gacar ve ark. tarafından bir *E.cloacae* suşundan ve Poirel ve ark. tarafından bir *P. putida* suşunda gösterilmiştir^{151,152,202}. Bizim çalışmamızda tanımladığımız *E. cloacae* suşu bu bakımdan ülkemizde tanımlanmış 4. VIM-5 enzimi olma özelliğindedir. Bu bilgilerle sadece ülkemizden vakalar halinde 3-5 yılda bir izole edilen bu MBL enzimi ileride yayılma tehlikesi olduğundan ve bir MBL enzimi olarak yüksek direnç oluşturma tehdidi söz konusu olduğundan sürekli izlemi yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Bu sonuçlarla; tüm dünyada olduğu gibi bölgemizde de klinik öneme sahip non-fermenter basil ve *Enterobacteriaceae* suşları arasında neredeyse tüm antibiyotiklere karşı yüksek derecede direnç olduğu belirlenmiş, tedavi edilemeyen infeksiyonlarda ise kolistin`in son seçenek olarak kullanılabileceği düşünülmüş, karbapenemaz aktivitesine sahip G.S.B.L. üreten suşların prevalansında artış olduğu, özellikle okzasilinazlar açısından ülkemizin endemizm seviyesine ulaştığı, tedavisi çok zor NDM-1 tipi karbapenemaz sentezleyen suşların ülkemize giriş yaptığı görülmüş, yerel bir veri olarak ülkemizde daha önce varlığı bildirilmeyen VIM-7 tipi MBL üreten *P. aeruginosa* suşunun çalışmamızda ilk kez tanımlandığı görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizdeki 3 hastanede yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli gram negatif basillerde fenotipik olarak antibiyotik direnci ile dirence yol açan genlerin genotipik özelliklerinin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışma sonunda;

1.Çalışmaya dahil edilen suşlar arasında Penisilin, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları,sefalosporinler, ertapenem, imipenem ve trimetoprim/sülfametaksazole karşı direncin %80 üzerine, aztreonam, meropenem, gentamisin, tetrasiklin, florokinolon tipi antibiyotiklere karşı direncin %50-70 aralığına, Kolistine ise %5.2 düzeyine ulaştığı,

2. Dirençli suşlar arasında ensık karşılaşılan karbapenemaz genlerinin, OXA-48 ve OXA-58 gibi D grubu karbapenemazlar olduğu, bunları non-fermentatif mikroorganizmalarda görülen GES ve PER enzimleri ile bazı *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* türlerinde görülen IMP, VIM, NDM gibi enzimlerin izlediği,

3. VIM-7 enzimini sentezleyen suşun ülkemizde ilk kez tanımlandığı sonucuna varılarak,

Bölgemizdeki dirençli suşlarda karbapenemaz genlerinin çeşitliliğinin global çeşitliliğe benzerlik gösterdiği, ülkemizde yeterli sayıda çalışma olmaması sebebi ile bölgemizin genel ülke profili içindeki yerinin bu sebeple tespit edilemediği, ancak yapılacak daha geniş bölge ve çok sayıdaki suşu ihtiva eden çalışmalar ile ülke profilinin çıkartılmasının gerekli olduğu, bu çalışmalar ile ülke direnç kalıplarının çıkartılması halinde ilginç direnç kalıpları ile karşılaşılabilceği düşünülmüş bu sonuçların varolan infeksiyon kontrol stratejilerini rasyonalize ederekuygulama aşamasında başarının artırılmasına katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Ayaz C.** Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi .3. baskı. *İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri*, **2008**; 266-78.
2. **Ghosh AS, Melquist AL, Young KD.** Loss of O-antigen increases cell shape abnormalities in penicilin-binding protein mutants of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett.* **2006**; 263: 252-7.
3. **Yıldırım A.**Extended Spectrum B-lactamase (G.S.B.L.) Araştırma Yöntemlerinin Karşılaştırılması: *E. colive Klebsiella spp.* suşlarında Sıklığının Saptanması. Uzmanlık tezi, *Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul.* **1999**.
4. **Özsoy FM, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A.**Genişletilmiş spektrumlu B-laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora dergisi*,**2001**; 6: 3-21.
5. **Sanders CC, Sanders WE.**B-lactam resistance in Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis*, **1992**; 14: 1089-1099.
6. **Erişim:** (http://www.ivytech.net/twmwphy/text_pg/pro=cell.htm). Erişim Tarih: 22.10.2010
7. **Gür D.** Hastane enfeksiyonlarında önem kazanan Gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*,**1997**; 1: 38-45.
8. **Masova I, Mobasheny S.** Kindship and diversification of bacterial penicillin binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**; 1-17.
9. **Quintiliani JR, Courvalin P.** Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): 6th Manual of Clinical Microbiology, ed.,*American Society of Microbiology*, Washington.**1995**; pp.1308-24.
10. **Livermore DM.**B-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*,**1998**; 41, 24-41.
11. **Yokoyama T, Honda J, Kawayama T, Kajimura K, Ozumi K.** Increased incidence of β -lactamase plazmid negative, high level methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Kurume Med J*,**1996**; 43 (3):199-206.
12. **Gür D.** Streptococcus pneumoniae: İzolasyon, tanı ve antibiyotiklere direnç. *ANKEM Dergisi*,**1995**; 9(3): 243-51.
13. **Öztürkeri H.** Streptococcus pneumoniae`de penisiline direnç mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, **1997**; 10(2): 51-4.
14. **Duemling WW.** Clinical experiences with penicillin in the Navy. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **1946**;48:201–218.
15. **Stansly PG, Shepherd RG, White HJ.** Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp*, **1947**; 81: 43–54.
16. **Bush K.** The bacterial cell wall as an antimicrobial target. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, **2013**; 1277: 5-6.
17. **Bush K, Jacoby GA.** Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **2010**; 54: 969–976.
18. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**; 39:1211–1233.

19. **Richmond, MH, Sykes RB.** The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological roles. *Adv. Microb. Physiol.* **1973**; 9:31–88.
20. **Ambler RP.** The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1980**; 289:321–331.
21. **Bush KS, Tanaka K, Bonner DP, Sykes RB.** Resistance caused by decreased penetration of β -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**; 27:555–560.
22. **Garau, G, García-Saez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, Frere JM, Dideberg O.** Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**; 48:2347–2349.
23. **Mammeri H, Nordmann P, Berkani A, Eb F.** Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**; 282:238–240.
24. **Weber DA, Sanders CC.** Diverse potential of β -lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**; 34: 156–158.
25. **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 β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**; 41: 563–569.
26. **Choury D, Szajnert MF, Joly-Guillou ML, Azibi K, Delpech M, Paul G.** Nucleotide sequence of the blaRTG-2 (CARB-5) gene and phylogeny of a new group of carbenicillinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**; 44: 1070–1074.
27. **Quale JS, Gupta BJ, Landman D.** Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**; 50:1633–1641.
28. **Jacoby GA.** AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**; 22: 161–182.
29. **Nordmann P, Mammeri H.** Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* **2007**; 2: 297–307.
30. **Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P.** Extended spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**; 53:1766–1771.
32. **Zscheck KK, Murray BE.** Nucleotide sequence of the β -lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**; 35:1736–1740.
33. **Matthew M.** Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother.* **1979**; 5: 349–358.
34. **Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R.** Plasmid determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1983**; 12:507–510.
35. **Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K.** Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42: 269–275.
36. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**; 48: 1–14.

37. **Robin F, Delmas J, Chanal C, Sirot D, Sirot J, Bonnet R.** TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother*, **2005**; 49:4443–4447.
38. **Sirot D, Recule C, Chaibi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Claris C, Labia R, Sirot J.** A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1997**; 41: 1322–1325.
39. **Melano R, Petroni A, Garutti A, Saka HA, Mange L, Pasteran F, Rapoport M, Rossi A, Galas M.** New carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2002**;46:2162–2168.
40. **Petroni A, Melano RG, Saka HA, Garutti A, Mange L, Pasteran F, Rapoport M, Miranda M, Faccione D, Rossi A, Hoffman PS, Galas MF.** CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 belongs to a family of cassette-encoded β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**; 48:4042–4046.
41. **Pottron A, Poirel L, Croize J, Chantepredrix V, Nordmann P.** Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2009**; 53: 3010–3016.
42. **Bradford PA.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev*, **2001**; 14: 933–951.
43. **Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P.** Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2001**; 45:1615–1620.
44. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, **2006**; 57: 373–383.
45. **Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**; 48: 15–22.
46. **Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL.** The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett*, **2006**; 258:72–77.
47. **Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A.** Novel carbapenemhydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2006**; 50: 1330–1335.
48. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20: 440–458.
49. **Bush K.** Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1989**; 33: 259–263.
50. **Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J.** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **2004**; 39:55–60.
51. **Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J.** Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med*, **2005**; 165: 1430–1435.

52. **Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**; 48: 4793–4799.
53. **Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y.** Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2007**; 51: 3026–3029.
54. **Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2005**; 49: 4423–4424.
55. **Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP.** First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2007**; 51: 1553–1555.
56. **Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ.** Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2007**; 51: 763–765.
57. **Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, Amicosante G, Frere JM, Galleni M.** Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1999**; 43: 902–906.
58. **Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Mussi MA, Moran-Barrio J, Vila AJ, Viale AM, Limansky AS.** A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother*, **2008**; 62: 336–344.
59. **Yotsuji A, Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S.** Properties of novel β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1983**; 24: 925–929.
60. **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol*, **2000**; 3: 489–495.
61. **Mercuri PS, Ishii Y, Ma L, Rossolini GM, Luzzaro F, Amicosante G, Franceschini N, Frere JM, Galleni M.** Clonal diversity and metallo- β -lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microb. Drug Resist*, **2002**; 8: 193–200.
62. **Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frere JM.** Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2001**; 45: 660–663.
63. **Garau G, García-Saez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, Frere JM, Dideberg O.** Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**; 48: 2347–2349.
64. **Segatore B, Massidda O, Satta G, Setacci D, Amicosante G.** High specificity of *cphA*-encoded metallo- β -lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **1993**; 37: 1324–1328.
65. **Yang Y, Bush K.** Biochemical characterization of the carbapenem- hydrolyzing β -lactamase AsbM1 from *Aeromonas sobria*. *AER 14M: a Lett*, **1996**; 137: 193–200.
66. **Hernandez Valladares M, Felici A, Weber G, Adolph HW, Zeppezauer M, Rossolini GM, Amicosante G, Frere JM, Galleni M.** Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. *Biochemistry*, **1997**; 36:11534–11541.

67. **Costello AL, Sharma NP, Yang KW, Crowder MW, Tierney DL.** X-ray absorption spectroscopy of the zinc-binding sites in the class B2 metallo- β -lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Biochemistry*, **2006**; 45:13650–13658.
68. **Gülay Z.** B-laktamaz inhibitörlerine direnç: TEM benzeri enzimler. *ANKEM Dergisi*, **1997**; 11(2):213-19.
69. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**; 39:1211-33.
70. **Livermore DM.** B-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, **1995**; 8: 557-84.
71. **Gür D.** AmpC ve Geniş spektrumlu β -laktamazlarda son gelişmeler. *ANKEM Dergisi*, **1997**; 11(2): 209-12.
72. **Çalangu S.** Sefalosporinler. Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. *Güneş Kitabevi*, **1994**: 103-22.
73. **Büyükbaba Ö, Katrancı H, Nakipoğlu Y, Derbentli G.** Gram olumsuz çomaklarda indüklenebilir β -laktamaz belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. *ANKEM Dergisi*, **1997**; 11(4): 419-28.
74. **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting. *Curr Opin Microbiol*, **2000**; 3:489-95.
75. **Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G.** Recent development in carbapenems. *Exper tOpin Investig Drugs*, **2002**; 11:529-44.
76. **Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V.** Imipenem/silastatin (1,5g daily) versus Meropenem (3,0gdaily) in patients within tra abdominal infections: Results of prospective, randomized, multicenter trial. *Scand J Infect Dis*, **1997**; 29: 503-8.
77. **Birnbaum J, Kahan FM, Kroop H.** Carbapenems, a new class of β -lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med*, **1985**; 78: 3-21.
78. **Nikaido H.** Role of permeability barrier in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*, **1985**; 27: 197-231.
79. **Yang Y, Bhached N, Bush K.** Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: Permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*, **1995**; 35: 75-84.
80. **Jackson JJ, Kroop H.** B-lactam antibiotics induced release of free endotoxin: In vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP)-2-specific imipenem and PBP3-specific ceftazidim. *J Infect Dis*, **1992**; 165: 1033-41.
81. **Gudmundsson S, Erlendsdóttir H, Gattfrendsson M, Gudmundsson A.** The post antibiotics effect induced by antimicrobial combinations. *Scand J Infect Dis*, **1990**; 74: 80-93.
82. **Yoshimura F, Nikaido H.** Diffusion of β -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*, **1985**; 27: 197-231.
83. **Edwards JR.** Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother*, **1995**; 36: 1-17.
84. **White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J.** Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**; 40: 904-8.

85. **GürD.** B-laktamazlar.*Flora*,**1997**; 283:3-16.
86. **Yang K, Livermore DM.** Interactions of meropenem with class C chromosomal beta lactamases. *J Antimicrob Chemother*, **1989**; 24: 187-96.
87. **Kitzis MD, Acar JF, Gutmann L.** Antibacterial activity of meropenem against gram negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, **1989**; 24:125-32.
88. **Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T.** Comparison of two carbapenems and imipenem affinities for penicillin-binding proteins and its release from these proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother*, **1990**; 34: 484-6.
89. **Cunha BA.** Ertapenem. A review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. *Drugs Today*, **2002**; 38:195-213.
90. **Pankuch GA, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC.** Anti pneumococcal activity of ertapenem(MK-0826) compared to those of other agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**; 46:42-46.
91. **Livermore DM, Carter MW, Bage IS.** Invitro activities of ertapenem (MK-0826) against recent clinical bacteria collected in Europe and Australia. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45: 1860-1867.
92. **Goldstein EJ, Citron DM, Vren MC, Warren Y, Tyrrell KL.** Comparative Invitro activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:2389-2394.
93. **Fuchs PC, Barry AL, Brown SD.** In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from 11 North American medical centers. *Antimicrob Agent sChemother*, **2001**; 45: 1915-1918.
94. **Gill CJ, Jackson JJ, Gerckens LS.** In vivo activity and pharmacokinetic evaluation of a novel long-acting carbapenem antibiotic, MK-826. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**; 42:1996-2001.
95. **Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M.** Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45:2831-2837.
96. **Sundelof JG, Hajdu R, Gill CJ.** Pharmacokinetics of L-749,345, a long-acting carbapenem antibiotic, in primates. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**; 41:1743-1748
97. **Sader HS, Galles AC.** Emerging strategies in infectious diseases: new carbapenem and trimethoprim bacterial agents. *Drugs*, **2001**; 61:553-564
98. **ECDC.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). **2010**. Stockholm: ECDC.
99. **Nordmann P, Dortet L, Poirel L.** Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends in Molecular Medicine*, **2012**; 18:263-72.
100. **Koo VSW, O' Neill P, Elves A.** Multidrug-resistant NDM-1 *Klebsiella* outbreak and infection control in endoscopic urology. *BJU international*, **2012**; 110: 922-926.
101. **Rasmussen B, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C et al.** Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1996**; 40: 2080–2086.

102. **Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S.rivers. *Emerg Infect Dis*, **2005**; 11: 260–264.
103. **Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P.** Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* s6. *Antimicrob Agents Chemother*. **1994**; 38: 1262–1270.
104. **Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfallera MA, Jonesa RN.** Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush Group 2f β -lactamase (SME-1) in the United States: Results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2001**; 39:125-7.
105. **Bush K, Pannell M, Lock JL, Queenan AM, Jorgensen JH, Lee RM, Lewis JS, Jarrett D.** Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. *Int J Antimicrob Agents*. **2013**; 41:1-4
106. **Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, Salimnia TT, Mitchell RA, Alangaden G, Salimnia H.** Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2011**; 71: 325-6.
107. **Carr r A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P.** Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents*. **2008**; 31: 181-2.
108. **Patel G, Bonomo RA.** “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, **2013**; 4: 1-17
109. **Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J et al.** Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J. Antimicrob.Chemother*. **2006**; 63: 427–437.
110. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. **2009**; 9: 228–236.
111. **Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ.** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin. Infect.Dis*. **2011**;53: 60–67.
112. **Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B et al.** Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin. Infect.Dis*. **2011**; 52: 848–855.
113. **Cuzon G.** Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg. Infect. Dis*. **2010**; 16: 1349–1356.
114. **Cuzon G.** Functional characterization of Tn4401, a Tn3- based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2011**; 55: 5370–5373.
115. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2001**; 45: 1151–1161
116. **Venezia SN.** First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2009**; 53: 818–820.
117. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis*, **2009**; 9: 228–236.

118. **Borer A, Saidel-Odes L, Riesenbergr K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M.** Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2009**; 30: 972–976.
119. **Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP.** Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, **2008**; 29: 1099–1106.
120. **Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y.** Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2008**; 52: 1028–1033.
121. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev*, **2005**; 18: 306–325.
122. **Kuwabara S, Abraham EP.** Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem. J*, **1967**; 103: 27C–30C.
123. **Iaconis JP, Sanders CC.** Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1990**; 34: 44–51.
124. **Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S.** Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1982**; 22: 564–570.
125. **Zhao WH, Hu ZQ.** IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit. Rev. Microbiol*, **2011**; 37: 214–226.
126. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20: 440–458.
127. **Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M.** Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**; 39: 824–829.
128. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1991**; 35: 147–151.
129. **Zhao WH, Hu ZQ.** IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol*, **2011**; 37: 214–226.
130. **Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL.** Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, **2012**; 25: 682–707.
131. **Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P.** First IMP-1- producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect*, **2006**; 12: 695–696.
132. **Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R.** Isolation of the first metallo- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quimioter*, **2008**; 21: 123–126.
133. **Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM.** First isolation of metallo- β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43: 516–519.
134. **Moulds NM, Thomson KS, Hanson ND.** IMP-27, a novel metallo β -lactamase (MBL) associated with a class II integron identified in an isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2011**; C1: 2112.

135. **Erişim:** <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>.
136. **Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A.** Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo- β -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase, and CMY-4 AmpC β -lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2006**; 50: 4198–4201.
137. **Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, Lee K, Chong Y.** Increasing prevalence and diversity of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2006**; 50: 1884–1886.
138. **Marcano D, Pasterán F, Rapoport M, Faccone D, Ugarte C, Salgado N, Payares D, Spadola E, López Y, Maggi G, Galas M, Sánchez D.** First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. *J. Infect. Dev. Ctries*, **2008**; 2: 241–244.
139. **Erişim:** <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8023>.
140. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2009**; 53: 5046–5054.
141. **Kumarasamy KK et al.** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, **2010**; 10: 597–602.
142. **Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR.** Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother*, **2011**; 66: 689–692.
143. **Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA.** Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11: 355–362.
144. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11: 381–93.
145. **Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG.** ARI1: β -lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, **1993**; 2: 81–87.
146. **Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P.** European Dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. **2011**; 17: E24–E26.
147. **Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al.** Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase blaKPC-gene. *Emerg Infect Dis*. **2010**; 16: 1349–1356.
148. **Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.** Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**, 2: 15–22.
149. **Toraman ZA, Yakupoğulları Y.** Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and ciprofloxacin use in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect*, **2003**; 54: 164-5.
150. **Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında Metallo B-Laktamaz Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2005**; 19: 101-105.

151. **Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G.** Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*, **2004**; 54: 282-3.
152. **Gacar GG, Midilli K, Kolayli F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, Karadenizli A, Vahaboglu H.** Genetic and Enzymatic Properties of Metallo β -Lactamase VIM-5 from a Clinical Isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2005**; 11: 4400–4403.
153. **Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P.** First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **2006**; 12: 695–699.
154. **Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS.** Occurrence and Characterization of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000–2004). *Microbial Drug Resistance*, **2006**; 12, 4-6.
155. **Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P.** Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2008**; 8: 2950–2954.
156. **Kulaha C, Mooijb MJ, Comerta F, Aktas E, Celebic G, Ozlua N, Rijnsburgerb MC, Savelkoulb PHM.** Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2010**; 36: 114–118.
157. **Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P.** Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2010**; 1: 1369–1373.
158. **Nazık H, Öngen B, Mete B, Aydın S, Yemis M, Kelesoglu MF, Ergul Y, Tabak F.** Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-I β -cr Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Istanbul, Turkey. *The Journal of International Medical Research*, **2011**; 39: 1932-1940.
159. **Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC.** Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in Turkey. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **2011**; 41:2-11.
160. **Sarf AN, Biçmen M, Gulay Z.** The First Report on the Outbreak of OXA-24/40-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn J Infect Dis*, **2013**; 66: 439-442.
161. **Bogaerts P, Naas T, Garch FE, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissioir B, Nordmann P, Glupczynski Y.** GES Extended-Spectrum β -Lactamases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2010**; 11: 4872–4878.
162. **Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, Bonnin RA, Arda B, Ozinel M, Ulusoy S, Bor C, Nordmann P.** GES-type and OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, **2013**; Nov 19.
163. **Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, Sandalli C.** OXA and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*, **2013**; 7: 1469-0691.
164. **Ergin A, Hascelik G, Eser OK.** Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **2013**; 45: 26–31.

165. **Balci M, Bitirgen M, Kandemir B, Anbas ET, Erayman I.** Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında Imipenem direnci ile ilişkili risk faktörleri. *Nobel Med*, **2012**; 8(3): 24-31.
166. **Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, **2010**; 65: 490-5.
167. **Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA.** A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, **2011**; 37: 356-9.
168. **Winstanley T, Courvalin P.** Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, **2011**; 24: 515-56.
169. **Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC.** Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41: 351–358.
170. **Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC.** Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2000**; 38: 59–67.
171. **Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms.** Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**; 36: 205-10.
172. **Nordmann P, Poirel L.** Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, **2013**; 68: 487-9.
173. **Yang Q, Zhang H, Wang Y, Xu Y, Chen M, Badal RE, Wang H, Ni Y, Yu Y, Hu B, Sun Z, Huang W, Wang Y, Wu A, Feng X, Liao K, Shen D, Hu Z, Chu Y, Lu J, Cao B, Su J, Gui B, Duan Q, Zhang S, Shao H, Kong H, Hu Y, Ye H.** A 10 year surveillance for antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community- and hospital-associated intra-abdominal infections in China. *J Med Microbiol*, **2013**; 62: 1343-9.
174. **Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G.** Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**; 35: 240-3.
175. **Lee YT, Huang LY, Chiang DH, Chen CP, Chen TL, Wang FD, Fung CP, Siu LK, Cho WL.** Differences in phenotypic and genotypic characteristics among imipenem-non-susceptible *Acinetobacter* isolates belonging to different genomic species in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*, **2009**; 34: 580-4.
176. **Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A.** Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*, **2013**; 41: 11-9.
177. **Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE.** *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, **2011**; 19: 419-26.
178. **Hancock REW.** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis*, **1998**; 27: 93–99.
179. **Fernández L, Breidenstein EB, Hancock RE.** Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat Drug Resist Updat*. **2011**; 14: 1-21.

180. **Atilla A, Eroğlu C, Esen S, Sünbül M, Leblebicioğlu H.** Investigation of the frequency of PER-1 type β -lactamase and antimicrobial resistance rates in nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiyol Bul.* **2012**; 46: 1-8.
181. **Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum β -lactamase PER-1 and metallo- β -lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 221-2.
182. **Eraç B, Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, Taşlı H, Aydemir Ş.** Prevalence of blaPER-1 and integrons in ceftazidime-resistant Gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* **2013**; 66: 146-8.
183. **Eraç B, Gülay Z.** Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum β -lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol (Praha)*, **2007**; 52: 535-41.
184. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.* **2011**; 11: 381-93.
185. **Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksall I.** Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo- β -lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist.* **2007**; 13: 191-8.
186. **Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM.** GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**; 57: 396-401.
187. **Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, Nogueira MC.** Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis.* **2012**; 3;12-176.
188. **Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF, Elkhizzi NA, Livermore DM.** Extended-spectrum and metallo- β -lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. *J Chemother.* **2012**; 24: 97-100.
189. **Girlich D, Poirel L, Szczepanowski R, Schlüter A, Nordmann P.** Carbapenem-hydrolyzing GES-5-encoding gene on different plasmid types recovered from a bacterial community in a sewage treatment plant. *Appl Environ Microbiol.* **2012**; 78: 1292-5.
190. **Borra PS, Leiros HK, Ahmad R, Spencer J, Leiros I, Walsh TR, Sundsfjord A, Samuelsen O.** Structural and computational investigations of VIM-7: insights into the substrate specificity of vim metallo- β -lactamases. *J Mol Biol.* **2011**; 411: 174-89.
191. **Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR.** Complete Sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the blaVIM-7 metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52: 3099-105.
192. **Aboufaycal H, Sader HS, Rolston K, Deshpande LM, Toleman M, Bodey G, Raad I, Jones RN.** blaVIM-2 and blaVIM-7 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in a tertiary care medical center in the United States: report from the MYSTIC program. *J Clin Microbiol.* **2007**; 45(2): 614-5.
193. **Jones RN, Deshpande L, Fritsche TR, Sader HS.** Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2004**; 49(3): 211-6.

194. **Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR.** blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**; 48(1): 329-32.
195. **Van der Bij AK, Pitout JD.** The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, **2012**; 67: 2090-100.
196. **Guran M.** Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae izolatlarında CTX-M tipi Geniş Spektrumlu B-Laktamaz genlerinin PCR, PCR-RFLP, Dizi Analizi yöntemleri ile identifikasyonu ve suşlar arasındaki klonal ilişkinin PFGE yöntemi ile belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana. **2011**.
197. **Alp E, Perçin D, Colakoğlu S, Durmaz S, Kürkcü CA, Ekincioglu P, Güneş T.** Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*, **2013**; 84: 178-80.
198. **Nazik H, Ongen B, Ilktac M, Aydin S, Kuvat N, Sahin A, Yemisen M, Mete B, Durmus MS, Balkan II, Yildiz I, Ergul Y.** Carbapenem resistance due to Bla(OXA-48) among ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **2012**; 43: 1178-85.
199. **Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, Nordmann P.** NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**; 56: 2784-5.
200. **Gulmez D, Woodford N, Palepou MF.** Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**; 31: 523–526.
201. **Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*, **2012**; 18: 413-31.
202. **Poirel L, Yakupoğullari Y, Kizirgil A, Dogukan M, Nordmann P.** VIM-5 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* from Turkey. *Int J Antimicrob Agents*, **2009**; 33: 284-287.

ÖZGEÇMİŞ

24.3.1987 tarihinde Lefkoşa K.K.T.C.`de doğdu. İlköğrenimini Fikri Karayel İlkokulunda, ortaöğrenimini Lefkoşa Bayraktar Türk Maarif Koleji`nde ve lise öğrenimini ise Lefkoşa Türk Maarif Koleji`nde tamamladı. Lisans eğitimini ise Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2008 yılında tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı`nda Klinik Mikrobiyoloji programında yüksek lisans eğitimini tamamladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.