



T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NON-FERMENTATİF GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE METALLO-BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Fatma Tuğba DİNÇ

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2013



T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NON-FERMENTATİF GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE METALLO-BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Fatma Tuğba DİNÇ

Danışman: Prof. Dr. Güher GÖRAL

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2013

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	31
Bulgular.....	41
Tartışma ve Sonuç.....	56
Kaynaklar.....	69
Teşekkür.....	79
Özgeçmiş.....	81

ÖZET

Bu çalışma nonfermentatif gram negatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz (MBL) varlığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile en uyumlu fenotipik testin saptanması amacıyla yapıldı.

Çalışmaya Haziran 2011 – Haziran 2012 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen; Phoenix (Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri) otomatize bakteri tanımlama ve duyarlılık test sisteminde imipenem (IMP) ve/veya meropenem (MRP) CLSI kriterlerine göre dirençli bulunan 35 *Pseudomonas* ve 35 *Acinetobacter* suşu alındı.

MBL varlığını belirlemek için modifiye Hodge test (MHT), Etest, çift disk sinerji testi (ÇDST), kombine disk testi (KDT); ayrıca *blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaSPM* genlerini saptamak için PCR kullanıldı.

Acinetobacter izolatlarının tümü IMP, MRP, seftazidim (CAZ) ve piperasilin-tazobaktama; *Pseudomonas* izolatlarının ise %85,7'si IMP, %88,5'i MRP, %54,2'si CAZ , %45,7'si piperasilin-tazobaktama dirençli bulundu. Çok ilaca dirençli *Acinetobacter* türleri %88,5, *Pseudomonas* türleri %28,5 saptandı.

Acinetobacter'lerin 29'unda (%82,8) Etest, 16'sında (%45,7) MHT, 14'ünde (%40) ÇDST, 5'inde (%14,2) KDT ile; *Pseudomonas*'ların 6'sında (%17,1) KDT, 5'inde (%14,2) CAZ-MPA ÇDST, 4'ünde (%11,4) IMP-EDTA ÇDST, 2'sinde (%5,7) Etest, 1'inde (%2,8) MHT ile MBL pozitifliği bulundu.

PCR ile *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının hiçbirinde *blaSPM* ve *blaNDM* pozitifliği saptanmadı. Sadece 3 *P. aeruginosa* izolatında (%8,5) *blaIMP*, 33 *Acinetobacter* izolatında (%94,2) ise *blaVIM* pozitif bulundu.

PCR sonuçları ile en uyumlu fenotipik testler *Pseudomonas* izolatları için IMP-EDTA ÇDST (duyarlılık %100, özgüllük %96); *Acinetobacter*

izolatları için Etest (duyarlılık %84,8; özgüllük %50) olup; bu testlerin moleküler yöntemlerle mutlaka doğrulanması gerekse de yapılamadığı durumlarda laboratuvarımızda MBL tanısında kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Metallo-beta-lactamase, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, PCR

SUMMARY

Investigation of Metallo-beta-lactamase Presence by Phenotypic and Genotypic Methods In Nonfermentative Gram Negative Bacteria

The aim of this study was to investigate the presence of metallo-beta-lactamase (MBL) by phenotypic and genotypic methods in nonfermentative gram negative bacteria and to determine the most compatible phenotypic method with polimerase chain reaction (PCR).

35 *Pseudomonas* spp., 35 *Acinetobacter* spp. strains isolated from various clinical specimens sent to Uludağ University Medicine Faculty Medical Microbiology laboratory between the dates of January 2011-January 2012 that were resistant to imipenem (IMP) and/or meropenem (MRP) by Phoenix (Becton Dickinson, United States of America) automated bacteria identification and susceptibility testing system according to CLSI criteria included in the study.

Modified Hodge test (MHT), Etest, double disc synergy test (DDST), combined disc synergy test (CDST) were used to determine the presence of MBL and PCR was performed to detect *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*NDM, *bla*SPM genes.

While all *Acinetobacter* spp. strains were found to be resistant to IMP, MRP, ceftazidime (CAZ) and piperacillin-tazobactam, the resistance rates of *Pseudomonas* spp. were 85,7% for IMP, 88,5% for MRP, 54,2% for CAZ and 45,7% for piperacillin-tazobactam. 88,5% of *Acinetobacter* spp. and 28,5% of *Pseudomonas* spp. were determined to be multi-drug resistant.

For *Acinetobacter* spp. strains, 29 isolates (82,8%) by Etest, 16 isolates (45,7%) by MHT, 14 isolates (40%) by DDST, 5 isolates (14,2%) by CDST were found as MBL positive; on the other hand for *Pseudomonas* strains 6 isolates (17,1%) by CDST, 5 isolates (14,2%) by CAZ-MPA DDST,

4 isolates (11,4%) by IMP-EDTA DDST, 2 isolates (5,7%) by Etest, 1 isolate (2,8%) by MHT were found as MBL positive.

*bla*SPM and *bla*NDM positivity was not detected neither *Acinetobacter* nor *Pseudomonas* strains by PCR. *bla*IMP was found positive in only 3 (8,5%) *P. aeruginosa* isolates and *bla*VIM was found positive in 33 (94,2%) *Acinetobacter* isolates.

The most compatible phenotypic tests with PCR results were IMP-EDTA DDST (sensitivity 100%, specificity 96%) for *Pseudomonas* isolates, and Etest (sensitivity 84,8%, specificity 50%) for *Acinetobacter* isolates. These tests must be confirmed by molecular methods; however at our laboratory they can be used to detect MBL in the situations that molecular methods couldn't be performed.

Key words: Metallo-beta-lactamase, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, PCR

GİRİŞ

Beta-laktam antibiyotikler bakterilerin transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerini inaktive ederek hücre duvar sentezini inhibe ederler (1). Bu antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotiğin beta-laktam halkasındaki siklik amid bağının parçalanmasıdır.

Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemleri hidrolize edebilen çeşitli beta-laktamaz enzimleri bulunmaktadır. Yapısal olarak 4 gruba ayrılan beta-laktamazlardan A, C ve D grubundakilerin aktif bölgelerinde serin aminoasidi; B grubu enzimlerin aktif bölgelerinde bir veya iki çinko (Zn^{+2}) iyonu yer alır. Zn^{+2} iyonu taşıyan bu metalloenzimler, monobaktamlar dışındaki tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğine sahiptirler. Diğer antibiyotik gruplarının çoğuna dirençli bakterilerle oluşan ciddi enfeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek olan karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde de metallo-beta-laktamazlar (MBL) önemli yer tutmaktadır (2).

Başlangıçta gram pozitif bakterilerde ve *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi fırsatçı gram negatif basillerde kromozomal enzimler olarak tanımlanan MBL'ları kodlayan genler; 1990'larda mobil DNA elemanları üzerinde de bulunmuş ve bu genlerin önemli gram negatif patojenler arasında hızla yayılımıyla klinik önemleri artmıştır (3). Ülkemizde ilk kez bir *Pseudomonas aeruginosa* izolatında saptanan MBL 2004 yılında raporlanmıştır (4). MBL'ları kodlayan genlerin bulunduğu integronlarda aminoglikozit, kloramfenikol gibi antibiyotiklere ve dezenfektanlara direnci kodlayan ek gen kasetleri de taşınabildiğinden ayrıca MBL'lara karşı klinik kullanımı olan herhangi bir inhibitör madde bulunmadığından tedavide ciddi sıkıntılar ortaya çıkmaktadır (3). Bu nedenlerle MBL üreten mikroorganizmaların laboratuvarlarda saptanması klinik açıdan son derece önemlidir.

Rutinde kullanılan duyarlılık testleri MBL varlığını göstermek için yeterli olamamaktadır. MBL varlığının araştırılması için Clinical and Laboratory Standarts Institue (CLSI)'nin önerdiği herhangi bir standart yöntem yoktur. En güvenilir olan MBL'ların moleküler yöntemler ile gen düzeyinde araştırılmasıdır. Rutin kullanımda bu yöntem pratik olmadığından MBL'ların bazı bileşiklerle inhibisyonuna dayanan çeşitli fenotipik metotlar geliştirilmiştir (5).

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli örneklerden izole edilen nonfermentatif gram negatif bakterilerde MBL üreten suşların sıklığını fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırmak ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile en uyumlu fenotipik testi saptamak amaçlanmıştır.

Nonfermentatif Gram Negatif Bakteriler

Fermentatif bakteriler hem aerop hem de anaerop ortamda karbonhidratları parçalayıp asit ve gaz oluştururken, nonfermentatif bakteriler karbonhidratlara anaerobik ortamda etkisizdirler; aerobik ortamda ise kısmen (oksidatif) ya da hiç (nonoksidatif) etki etmezler (6).

Çevrede yaygın olarak bulunan nonfermentatif gram negatif basiller aéropturlar, spor oluşturmazlar ve minimal üreme koşullarında üreyebilirler. Bu mikroorganizmaların yaşamlarını hastane ortamında da sürdürebilmeleri ve sıklıkla kullanılan antibiyotiklere dirençli olmaları nedeniyle hastane enfeksiyonlarında önemleri giderek artmaktadır (7).

Nonfermentatif bakteriler, immünsüprese bireylerde kolonize olduklarında ya da travma sonucu vücuda girdiklerinde enfeksiyona yol açabilirler. Klinik örneklerden izole edilen gram negatif basillerin beşte birinden daha azını oluştursalar bile neden oldukları hastane enfeksiyonları ile önem kazanmaktadırlar (8).

Nonfermentatif bakteriler içinde birçok cins bulunur: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Balneatrix*, *Bergeyella*, *Bordetella*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*,

Flavobacterium, *Moraxella*, *Myroides*, *Oligella*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Shewanella*, *Weeksella* vb. En sık karşılaşılan nonfermentatif gram negatif bakteriler *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleridir (9).

***Pseudomonas* Cinsi Bakteriler**

Pseudomonas türleri 0.5-1 x 1.5-5 mikrometre boyutlarında, sporsuz, genellikle hareketli gram negatif çomaklardır. Zorunlu aerop olarak tanımlanmalarına karşın elektron alıcısının nitrat veya arjinin olduğu durumlarda anaerop olarak da üreyebilirler. Sitokrom oksidaz pozitif olmalarıyla *Enterobacteriaceae* türlerinden ayrılırlar. Bazı türler kültürlerde karakteristik yayılabilen pigmentler (mavi renkli piyosyanin, sarı-yeşil renkli piyoverdin, kırmızı-kahverengi piyorubin) üretirler. Çevrede yaygın olarak bulunmalarına karşın normal, sağlıklı bireylerin deri ve mukozalarında nadiren rastlanırlar (10). Bu cins içindeki en önemli tür *P. aeruginosa* olup hastane patojenleri içinde en sık beşinci ve gram negatif bakteriler içinde *Escherichia coli*'den sonra en sık ikinci etkindir (6). Diğer önemli *Pseudomonas* türleri *P. putida*, *P. fluorescens* ve *P. stutzeri*'dir.

P. aeruginosa yapısal bileşenler, toksin ve enzimler gibi birçok virülans faktörüne sahiptir. Flajella, pili, lipopolisakkarit ve aljinat konak hücreye yapışmayı kolaylaştırır. Bir polisakkarit olan ve kapsülde yer alan aljinat, organizmayı fagositozdan ve antibiyotiklerin etkisinden korur; kistik fibrozularda enfeksiyon oluşumunda önemlidir. Bu hastaların gram boyalı preparatlarında etrafı koyu pembe boyanan (aljinat) gram negatif basillerin görülmesi mukoid *Pseudomonas* suşlarının göstergesi olabilir.

Ökaryotik hücrelerde protein sentezini bozan ekzotoksin A; piyosyanin, piyoverdin pigmentleri; ektima gangrenozumla ilgili elastaz enzimi; hemolizin, proteaz, fosfolipaz C, ekzoenzim S ve T diğer virülans faktörleridir.

Çok az besine gereksinim duymaları, geniş sıcaklık aralıklarını (4°C-42°C) tolere edebilmeleri, birçok antibiyotik ve dezenfektana dirençli olmaları nedeniyle *Pseudomonas*'lar doğada yaygın olarak bulunurlar. Özellikle geniş

spektrumlu antibiyotiklerle tedavi olan, solunum cihazı kullanan, hastanede uzun süre yatan hastaların solunum ve gastrointestinal sisteminde kolonize olabilirler.

Pek çok virülans faktörüne sahip olan *P. aeruginosa* fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır. Enfeksiyon oluşturabilmesi için konak faktörleri önem taşır (geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, normal barsak florasının baskılanması, deri bütünlüğünün bozulması, bağışıklık sisteminin çeşitli nedenlerle baskılanması).

Hastane enfeksiyonlarının önde gelen etkenlerinden *P. aeruginosa*'nın neden olduğu başlıca klinik tablolar solunum yolu, deri ve yumuşak doku, üriner sistem, kulak, göz enfeksiyonları ve bakteriyemidir.

Solunum yolu enfeksiyonları: *P. aeruginosa* asemptomatik kolonizasyondan akciğer parankiminde nekroza kadar gidebilen farklı klinik tablolardan sorumludur. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bronkopnömoninin mortalitesi %70'lere varabilmektedir. Kistik fibrozlu hastaların örneklerinden izole edilen mukoid kökenler birçok antibiyotiğe dirençli olduğundan eradikasyonları zordur (10). Bu hasta grubunun kronik akciğer enfeksiyonlarında en önemli morbidite ve mortalite nedenidir (11).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları: Yanık yaralarında en önemli enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa*'dır. Kontamine su ile temas sonucu oluşan folikülitler, su ile sık temasa bağlı tırnak enfeksiyonları, penetran travma sonucu oluşan osteokondrit *P. aeruginosa*'nın neden olduğu diğer deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır.

Üriner sistem enfeksiyonları: Genellikle uzun süreli üriner kateter uygulanan hastalarda görülmektedir.

Kulak enfeksiyonları: *P. aeruginosa* sıklıkla yüzmenin önemli risk faktörü olduğu eksternal otitin (yüzücü kulağı); ayrıca yaşlı ve diyabeti olan kişilerde görülen, komşu kraniyal dokunun invazyonuna yol açabilen malign eksternal otitin etkenidir.

Göz enfeksiyonları: Korneanın travması ve kontamine su ile teması sonucu oluşur; tedavi edilmezse korneal ülser ve göz kaybı gelişebilir.

Bakteriyemi: Nötropenili, diyabetli, geniş yanığı olan hastalarda ve hematolojik malignansilerde daha sık gözlenir. Hastaların çok az kısmında ektima gangrenozum denen karakteristik eritematöz deri lezyonları gelişir.

P. aeruginosa hematojen yayılım ile endokardit, menenjit, beyin apseleri, kemik ve eklem enfeksiyonları gibi diğer klinik tablolara da neden olabilmektedir.

Klinik örneklerde daha nadir bulunan *P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. stutzeri* türlerinin saptanması durumunda klinik tablonun sorgulanması gerekir; geçici kolonizasyon, örnek alımı veya laboratuvar uygulamaları sırasında bulaş nedeniyle bu türlerin izole edilebileceği akılda tutulmalıdır.

Pseudomonas türleri kanlı agar, MacConkey agar gibi rutin katı besiyerlerinde kolaylıkla ürerler, buyyonda üreme ise oksijen konsantrasyonunun en fazla olduğu yüzeyde gerçekleşir. *P. aeruginosa* genelde kenarları girintili çıkıntılı olan kolonileri, beta-hemolizi, üzüksü kokusu, oksidaz pozitifliği, 42°C'de üreyebilme özelliği, piyoverdin ve sadece bu türde olan piyosyanin pigmenti ile rahatlıkla tanınabilirse de diğer türlerin tanımlanabilmesi için ek testler gerekebilir (10). Bazı *P. aeruginosa* kolonilerinin mukoid, düzgün ve cüce (küçük koloni varyantı) görünümü olabileceği de hatırlanmalıdır (12).

P. fluorescens ve *P. putida*'nın belirgin koloni morfolojisi ve kokusu yoktur. *P. fluorescens*, *P. putida*'dan 4°C'de üreyebilmesi ve jelatini hidrolize edebilmesi ile ayırt edilebilir. *P. stutzeri* pek çok besiyerinde kuru, buruşuk, agara yapışık, sarı-kahverengi koloniler oluşturabilir; diğer türlerden farklı olarak nişastayı hidrolize eder (13).

Pseudomonas enfeksiyonlarının tedavisi bakterinin birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeniyle zordur. Monoterapi genellikle etkisizdir ve dirençli kökenlerin gelişimine neden olur. Tedavi sırasında duyarlı suşlar bile antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin indüklenmesi, dış membran proteinlerini kodlayan genlerde mutasyon veya plazmid aracılı direnç aktarımı ile dirençli hale geçebilir. Tedavide başarı için etkili antibiyotiklerin kombinasyonu (aminoglikozid-beta-laktam antibiyotikler) gereklidir (10).

***Acinetobacter* Cinsi Bakteriler**

Acinetobacter türleri hareketsiz, kısa, tombul, logaritmik üreme fazında 1-1.5 ile 1.5-2.5 µm boyutlarında, durağan fazda kokoid görünümde olan; gram negatif (bazen dekolarizasyona dirençli) basillerdir. Çiftler ya da kümeler halinde görülürler. Gram boyanma değişkenliği, hücre boyut ve düzenlenmesinde çeşitlilik sıklıkla saf kültürde bile gözlenebilir. Zorunlu aerop, sporsuz, oksidaz negatif ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır (14). Oksidaz negatif olmaları ile *Neisseria* ve *Moraxella* türlerinden, nitratları redükte etmemeleri ve anaerobik şartlarda ürememeleri ile enterobakterilerden ayırt edilebilirler (9).

Acinetobacter cinsi içinde 11'i isimlendirilmiş 25 genomik tür bulunur. *A. calcoaceticus-baumannii* kompleks laboratuvarlarda zor ayırt edilen 1,2,3 ve 13 genom türlerini içerir. DNA gruplarının fenotipik ayrımı zor olduğundan *Acinetobacter* türleri sakkarolitik (en sık *A. baumannii*) ve asakkarolitik (en sık *A. Iwoffii* ve *A. haemolyticus*) olmak üzere 2 grupta incelenirler (15).

Bazı nadir suşlar dışında *Acinetobacter* suşlarının büyük bir çoğunluğu tek bir karbon ve enerji kaynağı içeren basit mineralli besiyerlerinde üreyebilir. Kültür için tavsiye edilen sıcaklık 30°C olmakla birlikte sıklıkla izole edilen genomik türler 37°C ve üzerinde ürerler. *Acinetobacter* kolonileri genelde düzgün, bazen mukoid, donuk sarı ve gri-beyaz renktedir. Bazı çevresel suşların difüze olabilen kahverengi pigmenti de tanımlanmıştır. Koloni boyutları *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerine benzer; bazı klinik izolatlar koyun kanlı agarda hemoliz yapabilir (14).

Acinetobacter cinsi bakteriler nispeten düşük düzey patojenler olarak kabul edilmektedir. Ancak (i) L-ramnoz, D-glukoz, D-glukuronik asit ve D-mannozdan oluşan; bakteriyi fagositozdan koruyan polisakkarit kapsül varlığı, (ii) fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit varlığında insan epitelyal hücrelerine yapışma özelliği, (iii) doku lipidlerini hasarlayabilen enzimlerin üretimi, (iv) hücre duvarının lipopolisakkarit bileşeninin potansiyel toksik etkisi ve lipid A varlığı enfeksiyondan sorumlu suşların virülansını arttırabilir. *Acinetobacter* septisemisinde gözlenen semptomlardan muhtemelen in vivo endotoksin

üretimi sorumludur. Bazı *Acinetobacter* suşlarının aerobaktin ve demirle baskılanabilen dış membran reseptör proteinleri gibi sideroforlar ürettiği de gösterilmiştir.

Acinetobacter türleri çevre (toprak, gıda, su, eşya, hava, lağım vb) dışında normal sağlıklı popülasyonun florasında da bulunabilmektedir (9). *A. johnsonii*, *A. Iwoffii* ve *A. radioresistens* gibi asakkarolitik türler cildin yanı sıra orofarenks ve vajinada kommensal olarak yer alırlar. Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık izole edilen tür *A. baumannii*'dir. Antimikrobiyal çoklu direnç kazanma ve dış ortamda birçok yüzeyde canlı kalma yeteneği bu bakterinin hastane enfeksiyonlarındaki önemini arttırmaktadır.

A. baumannii solunum sistemi (özellikle ventilatör ile ilişkili pnömoni), bakteriyemi, üriner sistem ve yara enfeksiyonları, endokardit, menenjit, osteomyelit, artrit, peritonit, korneal perforasyon gibi klinik tablolarla ilişkilendirilmiştir.

Ventilatör ile ilişkili pnömonide risk faktörleri antibiyotik tedavisi, cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyon ve yoğun bakım ünitesinde yatıştır. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların sindirim sisteminin, nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu olan çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* için rezervuar olduğu gösterilmiş ve fekal sürveyans programı önerilmiştir.

A. Iwoffii diğer *Acinetobacter* türlerine göre menenjitle daha fazla ilişkilendirilmiştir (15). Menenjit olgularının çoğunda lomber ponksiyon, ventrikülografi gibi cerrahi girişim öyküsü bulunmaktadır.

Üriner sistem enfeksiyonları en sık yaşlı debil hastalar ile yoğun bakım ünitelerinde yatan ve kalıcı idrar kateteri bulunan hastalarda görülür.

Tanıda gram boyalı preparat incelemesinde hem gram negatif hem de dekolizasyon zorluğu nedeniyle gram pozitif boyanabileceği, üreme fazına göre morfolojisinin değişebileceği hatırlanmalıdır.

Acinetobacter türlerinin izolasyonunda genellikle Eosin-Metilen-Blue (EMB) ve kanlı agar gibi rutin besiyerlerinin yanı sıra Herellea agar, Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) gibi seçici ve ayırt edici besiyerleri de kullanılabilir. Tanı için çeşitli fenotipik identifikasyon şemaları tanımlanmış

olmakla birlikte farklı genomik türlerin fenotipik identifikasyonunda tek veya birkaç test yeterli olmamakta; kesin tiplendirme için çeşitli ticari sistemler, plazmid profilleri ve PCR gibi moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Trimetoprim-sulfametoksazol, karbapenemler, tikarsilin-klavulanat, ampicilin-sulbaktam, doksisiklin ve kinolonlar *Acinetobacter* türlerinin çoğuna etkili olabilmektedir (9). Bununla birlikte hastane salgınlarında karbapenem ve kolistin direnci de dahil çoklu dirençli suşlar giderek yaygınlaşmakta ve tedavi zorlaşmaktadır. *A. baumannii* klinik izolatlarına in vitro aktivitesi umut veren tigesikline karşı da direnç bildirilmiştir. Plazmid ya da kromozom kaynaklı beta-laktamazlar, dış membran proteinleri ile penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklikler ve eflüks pompası beta-laktam direncinden sorumlu mekanizmalardır. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinden şüpheleniliyorsa intravenöz kolistin ile rifampin ve imipenem kombinasyonu önerilmektedir (16). Asıl önemli nokta direnç konusunda bölgesel farklar nedeniyle klinik olarak önemli her suş için in vitro duyarlılık test sonuçlarına göre özgül tedavinin planlanmasıdır.

Beta-Laktam Antibiyotikler

Güvenli olmaları, etki spektrumlarının geniş olması ve kimyasal yapılarında değişikliklerle aktivitelerinin arttırılabilmesi nedeniyle beta-laktam antibiyotikler, toplam antibiyotik kullanımının %60'ını oluşturmaktadır (17). Bu gruptaki antibiyotiklerin ortak özelliği gruba adını veren dört üyeli bir beta-laktam halkası içermeleridir. Bu halkaya bağlanan farklı gruplar her bir beta-laktam antibiyotik çeşidine farklı özellikler kazandırmaktadır.

Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezinde görevli transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerini diğer adıyla PBP'leri inhibe ederek etki gösterirler. PBP'lerin inhibisyonu bakterinin ozmotik güçlere dayanmasını engelleyerek lizisine neden olur (1). Beta-laktam antibiyotikler ayrıca peptidoglikan tabakanın hidrolize edilmesini sağlayan bakteriyel otolizinlerin üzerindeki inhibitör baskıyı da kaldırarak antibakteriyel etkinlik göstermektedir.

Beta-laktam antibiyotikler penisilinler, beta-laktamaz inhibitörleri (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam), sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler olmak üzere başlıca beş grupta toplanırlar:

Penisilinler: Temel yapıyı bir beta-laktam halkası, bir tiyazolidin halkası ve değişen yan zincir oluşturmaktadır. Antibakteriyel etkinliklerine göre doğal penisilinler, penisilinaza dirençli penisilinler, aminopenisilinler, karboksipenisilinler ve açil üreidopenisilinler olmak üzere beş grupta incelenebilirler.

En eski antibiyotiklerden olan doğal penisilinler beta-laktamaz üretmeyen gram pozitif bakterilere, anaeroplara ve *Neisseria* gibi seçilmiş gram negatif koklara oldukça etkilidir. Penisilinaza dirençli penisilinler, penisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* için seçilecek ilaç olup streptokoklara da etki ederler. Aminopenisilinler, doğal penisilinlerin spektrumuna ek olarak beta-laktamaz üretmeyen gram negatif koklara ve enterobakterlere; karboksipenisilinler ve üreidopenisilinler ise ampisiline dirençli *P. aeruginosa* gibi gram negatif basillere etkilidirler.

Beta-laktamaz inhibitörleri: Zayıf antibakteriyel etkileri olan; asıl etkinliklerini beta-laktamazların aktif bölgesine geri dönüşümsüz bağlanıp, inhibe ederek gösteren maddelerdir (klavulonat, sulbaktam ve tazobaktam). Bu nedenle intihar molekülleri olarak adlandırılırlar. Günümüzde klinik kullanımda olan beş beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonu bulunmaktadır: Amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam, tikarsilin-klavunat ve piperasilin-tazobaktam. Etki spektrumlarına stafilokok penisilinazları, *E. coli*, gonokoklar gibi gram negatif bakterilerin TEM, SHV, OXA, PSE gibi beta-laktamazları girmektedir. *P. aeruginosa*, *Citrobacter* gibi gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen kromozomal sınıf I beta-laktamazlara etkisizdirler (18).

Sefalosporinler: Yapılarında penisilinlerdeki tiyazolidin yerine dihidrotiyazin halkası bulunur. Bu halkanın beta-laktam halkasıyla birleşmesiyle sefem çekirdeği oluşur. Sefem halkasının 1., 3. ve 7. pozisyonlarına yapılan eklemelerle türevleri oluşturulur. Mikrobiyal etki spektrumuna göre sefalosporinler dört kuşakta incelenmektedir.

Birinci kuşak sefalosporinler enterokoklar, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve yüksek düzey penisilin dirençli pnömokoklar dışında tüm gram pozitif koklara etkilidirler. Sefalotin stafilokokkal beta-laktamazlara direnci nedeniyle stafilokoklara; sefazolin ise *Klebsiella* türlerine ve *E. coli*'ye daha fazla etkindir.

İkinci kuşak sefalosporinlerin gram negatif basil etkinlikleri arttırılmış olup gram pozitif bakterilere etkinlikleri değişkenlik gösterir. Solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde en seçkin gruptur. Bu grupta bulunan sefemisinler, gram negatif anaerob bakterilere de etkilidirler.

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin gram negatif etkinlikleri çok güçlü iken gram pozitif etkinlikleri azalmıştır. Beyin omurilik sıvısına (BOS) kolay geçebilme özelliğindedirler. Bu grupta diğerlerinden farklı olarak *P. aeruginosa* etkinliği güçlü olan seftazidim, sefoperazon gibi antibiyotikler bulunur.

Dördüncü kuşak sefalosporinlerin diğer sefalosporinlerden en önemli farkı indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) ve bazı genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) salgılayan bakterilere etkili olmasıdır. Diğer sefalosporinler gibi MRSA ve enterokoklara etkinlikleri yoktur (19).

Monobaktamlar: Doğal monosiklik (sadece beta-laktam halkası olan) antibiyotiklerdir. PBP'lere zayıf bağlanmaları nedeniyle gram pozitif ve mutlak anaerob mikroorganizmalara etkisiz olup yalnız gram negatif aerobik bakterilere etkilidirler. Tedavide kullanıma giren tek monobaktam aztreonamdır. Serin beta-laktamaz ve MBL enzimleri tarafından hidrolize edilememekle birlikte GSBL'ler tarafından hidrolize edilmektedir. Bu nedenle ciddi olguların ampirik tedavisinde tek başına kullanılması önerilmemektedir.

Karbapenemler: Bilinen en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahiptirler. *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin bileşiğinin türevleridir. GSBL ve AmpC beta-laktamaz enzimlerine dirençli olduklarından ciddi enfeksiyonların tedavisinde en önemli seçenektir. Temel yapı penisilinin beta-laktam halkasına benzemektedir ancak bu yapıda 1. pozisyondaki sülfür yerine karbon bulunmakta; 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağ

yer almaktadır. Hidroksietil yan zincirindeki farklı *trans* konfigürasyonu nedeniyle pek çok beta-laktamaza dayanıklıdır.

Eski karbapenemlerden imipenem, renal tübüllerdeki dihidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimi tarafından yıkıldığından silastatin gibi DHP-1 inhibitörüyle birlikte uygulanması gerekir. Meropenem, ertapenem ve doripenem gibi bu sınıfa daha geç eklenenlerin DHP-1'e karşı stabiliteleri artmıştır (20). Diğer yeni karbapenemler ise biapenem, faropenem ve panipenemdir (21).

İmipenem, meropenem, doripenem gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterilerin büyük bir kısmına *in vitro* etkili iken *Enterococcus faecium*, MRSA ve *S. maltophilia*'ya etkisizdirler. Meropenemin gram negatif mikroorganizmalara etkinliği imipenemden iyidir. Ertapenemin etki spektrumu imipenem, meropenem ve doripeneme göre daha dardır (*P. aeruginosa* ve enterokok türlerine etkisiz). İmipenem, meropenem ve doripenemin *in vivo* yarı ömrü 1 saat iken ertapenemin yaklaşık 4 saattir; bu nedenle günde tek doz kullanıma uygundur (22). İmipenem ve meropenemin ciddi nozokomiyal enfeksiyonların tedavisi için saklanması; nonfermentatif mikroorganizmalara etkinliği az olan ertapenemin ciddi toplum kökenli enfeksiyonlar için kullanılması önerilmektedir (20). Doripenem ise duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike intraabdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonları, hastane kökenli pnömoni ve ventilatör ile ilişkili pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır (23).

Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklerin etkinliği hedefe ulaşabilme, beta-laktamazların enzimatik inaktivasyonuna direnç gösterebilme ve hedef PBP'leri inhibe edebilme yeteneklerine bağlıdır. Hedef PBP'lerde değişiklikler, ilacın hücreye girişini ve hücre içi konsantrasyonunu etkileyen faktörler, etken maddeyi inaktive eden beta-laktamaz üretimi beta-laktam direncine neden olur (1).

Hedef bölgenin değişimi: PBP'ler molekül ağırlıklarına göre 1-6 arası sayılarla adlandırılırlar. Aynı molekül ağırlığında birden fazla PBP varsa

sayıların yanına harfler eklenir (PBP1a gibi). Değişik PBP'lerin farklı beta-laktam antibiyotiklere bağlanma afiniteleri ve etkilendikleri ilaç konsantrasyonları farklıdır (24). Hedef PBP'lerde değişime bağlı direnç PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe azalmış afinitesi, dirençli bir PBP kazanılması veya hedef PBP sayısında artma ile oluşmaktadır (1).

PBP değişimine bağlı direnç gram pozitif bakterilerde gram negatif bakterilere göre daha sıktır. *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* ve *E. faecium* gibi gram pozitif bakterilerde ve *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *P. aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *A. calcoaceticus* gibi gram negatif bakterilerde bu direnç şekli bildirilmiştir (25).

İlacın hücre içine girişinin önlenmesi: Gram negatif bakterilerde beta-laktam molekülleri dış membranı dış membran proteinleri (OMP) adı verilen porlar yoluyla geçmektedir. Bu porların özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) antibiyotiğin bakteri hücrelerine giriş hızını belirlemektedir. Özellikle imipeneme dirençli *P. aeruginosa*'da karbapenemlerin kullandığı OprD kanalının eksik olduğu saptanmıştır.

Antibiyotiklerin bakteri hücrelerinden dışarı atılması da ilacın hücre içi yoğunluğunu azaltan bir diğer mekanizmadır. Son yıllarda birçok bakteride çoklu antibiyotik direncinden sorumlu çeşitli atım pompaları tanımlanmıştır. Örneğin *P. aeruginosa*'da sitoplazmik membran proteini MexB, MexD veya MexF enerji bağımlı bir pompa olarak iş görmektedir (26).

Beta-laktamaz enzimlerinin üretimi: Klinik önemi olan gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direncin en sık nedeni onları hidrolize eden beta-laktamaz enzimlerinin üretilmesidir. Beta-laktamazlar fonksiyonel özellikleri veya primer yapılarına göre sınıflandırılırlar. Protein sekanslarına göre yapılan en basit sınıflama Ambler sınıflaması olup; bu sınıflamada beta-laktamazlar korunmuş ve ayırt edici aminoasit motifleri göz önünde bulundurularak dört moleküler sınıfa (A, B, C ve D) ayrılırlar. A, C ve D sınıflarında bulunan enzimlerin aktif bölgelerinde serin aminoasiti; moleküler sınıf B'de yer alan enzimlerin (metalloenzimler) aktif bölgelerinde ise en az bir çinko iyonu bulunur. Fonksiyonel sınıflama daha subjektif kabul edilmekle

birlikte klinikte direnç profilinin enzim özellikleri (hidrolitik / inhibitör) ile ilişkilendirilmesine yardım eder. Beta-laktamazların fonksiyonel sınıflaması 1995 yılında Bush ve ark. (27) tarafından yayınlanmış, en son 2009 yılında güncellenmiştir (28). Güncellenmiş sınıflamadaki ana gruplar moleküler sınıflama ile daha uyumludur ve grup 1 (sınıf C) sefalosporinazları; grup 2 (sınıf A ve D) geniş spektrumlu, inhibitör dirençli ve serin karbapenemazları; grup 3 MBL'ları içermektedir. Beta-laktamazların yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre güncel sınıflandırması Tablo-1'de yer almaktadır.

Tablo-1: Beta-laktamazların sınıflandırılması (28).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino-β-lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino-β-lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino-β-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

Bush-Jacoby sınıflandırması:

Grup 1 sefalosporinazlar: Pek çok enterik bakterinin kromozomlarında kodlanan, moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır. Klavulanik asit ile inhibisyona genellikle dirençlidirler; benzilpenisilinden daha çok sefalosporinlere ve sefamisinlere etkilidirler. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ve *P. aeruginosa* dahil pek çok bakteride indüklenbilir özellikte, düşük düzeyde AmpC ekspresyonu bulunur. Büyük miktarlarda üretildiklerinde, karbapenemlere direnç gelişmesine neden olurlar. CMY, ACT, DHA, FOX, MIR gibi plazmid aracılı grup 1 enzimler 1989'dan beri bilinmekle birlikte grup 2be GSBL'lerden daha az sıklıkta bulunurlar.

Yeni alt grup 1e diğer oksimino-beta-laktamlara göre seftazidime daha etkilidir, genişlemiş spektrumlu AmpC (ESAC) diye adlandırılırlar; *E. cloacae*'deki GC1, plazmid aracılı CMY-10, CMY-19, CMY-37 ve diğerlerini içerir. Yakın zamanda *P. aeruginosa*'da imipeneme karşı artmış aktivite gösteren bir AmpC varyantı tanımlanmıştır (29). Klinikte direnç problemi çoğunlukla enzim üreten mikroorganizmada porin mutasyonu varlığında ortaya çıkar.

Grup 2 serin beta-laktamazlar: GSBL'lerin son 20 yılda artan identifikasyonuna bağlı olarak tanımlanan en geniş beta-laktamaz grubudur. Moleküler sınıf A ve D'yi kapsar, grup 2d'deki oksasilinazlar dışında tamamı moleküler sınıf A'da yer alır.

Grup 2a: Bu gruptaki enzimler penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize eder. Stafilokoklar gibi gram pozitif bakterilerdeki baskın beta-laktamazlardır. Bazı stafilokokkal penisilinazlar plazmidde kodlanmış olsa da bu enzimlerin çoğu kromozomaldır.

Grup 2b: Penisilin ve 1. kuşak sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit ve tazobaktamla inhibe olan enzimlerdir. Plazmid kontrolünde olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır; 1995'ten beri bu grupta en az 9 TEM, 29 SHV enzimi tanımlanmıştır.

Grup 2be: GSBL'leri içeren gruptur. Grup 2b'nin etki spektrumuna ek olarak sefotaksim, seftazidim gibi bir ya da daha fazla oksimino-beta-laktamı

da hidrolize ederler. Klavulanik asitle inhibisyona duyarlıdırlar. Grup 2be'nin ilk ve en büyük alt grubu, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden türemiştir. Bu grupta bulunan *Kluyvera* türlerindeki kromozomal beta-laktamazlarla ilişkili CTX-M enzimlerinin çoğu ise sefotaksimi seftazidimden daha kolay hidrolize ederler. BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 ve PER ve VEB enzim aileleri gibi daha nadir olan GSBL'ler de vardır.

Grup 2br: Klavulanik asit ve ilgili inhibitörlere dirençli, grup 2b etki spektrumuna sahip enzimlerdir. TEM-30, TEM-31 ve SHV-10 bu gruptadır.

Grup 2ber: Klavulanik asit inhibisyonuna daha dirençli TEM enzimlerini içerir. Bazılarında klavulanik asit direnci düşük düzeydedir; bunlara kompleks mutant TEM (CMT) beta-laktamazlar da denir [Örn: TEM-50 (CMT-1)] (28).

Grup 2c: Karbenisilini hidrolize eden ve klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olan enzimleri içerir. PSE-1, PSE-3, PSE-4 enzimleri, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve 2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1 enzimi bu gruptadır (27).

Grup 2ce: Yakın zamanda tanımlanan sefepim ve sefpiroma karşı etkili genişlemiş spektrumlu karbenisilinaz RTG-4 (CARB-10)'ü içerir.

Grup 2d: Bu grupta oksasilini ya da kloksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidrolize edebilen OXA enzimleri yer almaktadır. OXA enzimleri beta-laktamazların ikinci büyük ailesini oluşturur. OXA ailesi üyelerinin çoğu fonksiyonlarından ziyade korunmuş aminoasit motiflerine göre tanımlanır. Bu gruptaki enzimler çoğunlukla NaCl tarafından inhibe edilir.

Grup 2de: Karbapenemler hariç genişlemiş spektrumlu oksimino beta-laktamları, oksasilini ya da kloksasilini hidrolize eden enzimleri içerir. Çoğu OXA-10'dan köken alır, OXA-10 ve OXA-15 gibi enzimler bu grupta yer alır. Çoğunlukla Türkiye ve Fransa'da izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında bulunur. Seftazidim direnci genellikle sefotaksim direncinden daha çok göze çarpar.

Grup 2df: Karbapenemleri hidrolize edebilen OXA enzimleridir. Sıklıkla *A. baumannii*'de bulunur ve kromozomal genler tarafından üretilir. *Enterobacteriaceae*'da plazmid kaynaklı OXA-23 ve OXA-48 enzimleri de

tanımlanmıştır. Alt grup 2d' de 2d grubunun özelliği daha baskındır; oksasilini karbapenemlerden 40-50 kat daha hızlı hidrolize ederler ancak OXA-50'nin oksasilin hidrolizi saptanmamıştır. Bu gruptaki enzimler klavulanik asitle inhibe olmazlar.

Grup 2e: Klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olan ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilen sefalosporinazlardır. Direnç profillerinin benzerliği ve benzer mikroorganizmalarda bulunmaları nedeniyle bu gruptaki enzimler, grup 1 AmpC enzimleri ya da GSBL'ler ile karıştırılabilir. AmpC enzimlerinden aztreonama olan düşük afiniteleriyle ayrılabilirler.

Grup 2f: Moleküler sınıf A'daki serin karbapenamazlardır. IMI-1 ve NMC-1'in yanı sıra SME ailesi, kromozomal grup 2f enzimlerindedir. Bu grupta plazmidde kodlanan KPC ve bazı GES (eski adıyla IBC) enzimleri önem taşır. Özellikle KPC karbapenamazlar, hastanelerdeki çoklu ilaç dirençli gram negatif enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir.

Grup 4 beta laktamazlar: Bu enzimler henüz kesin olarak tanımlanmamış olup; 1995 fonksiyonel sınıflamasında yer almakla birlikte 2009 sınıflamasına dahil edilmemişlerdir. Bilgilerimiz arttıkça muhtemelen mevcut enzim gruplarından birine dahil edileceklerdir.

Grup 3 MBL'lar: Yapısal ve fonksiyonel olarak özgün bir beta-laktamaz grubudur. Yapısal olarak aktif bölgelerinde çinko iyonuna gerek duyarlar, fonksiyonel olarak ise karbapenemleri hidrolize edebilirler. Bu özellikleri ile diğer beta-laktamazlardan ayrılırlar. Ancak bazı serin beta-laktamazlar da karbapenemleri hidrolize edebilme özelliğine sahiptirler. Serin beta-laktamazların aksine MBL'ların monobaktamlara afinitesi düşüktür ve klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olmazlar. Etilendiamintetraasetikasit (EDTA), dipikolinik asit ya da 1,10-o-fenantrolin gibi metal iyon şelatörleri tarafından inhibe edilirler (28). Farklı MBL'ların diğer beta-laktamlara etkinlikleri ve substrat özgüllükleri değişkendir. Karbapenemaz aktiviteleri ve inhibitörlere direnç, MBL'ların klinik kullanımda endişe veren özellikleridir.

MBL'lar, serin beta-laktamazlardan yaklaşık 25 yıl sonra 1960'ların ortalarında keşfedilmişlerdir (3). MBL'lar başlangıçta gram pozitif bakteriler ve *B. fragilis* ve *S. maltophilia* gibi fırsatçı gram negatif basillerde kromozomal enzimler olarak tanımlanmış ve sayıları yıllarca görece sabit kalmıştır (28). Mobil DNA elemanları üzerinde taşınan ve MBL kodlayan genlerin önemli gram negatif patojenler arasında yayılması ile 1990'larda bu enzimlerin klinik önemi artmıştır (3).

MBL'ların sınıflandırılması: MBL'lar fonksiyonları (3a, 3b ve 3c alt grupları) veya yapıları (B1, B2 ve B3 alt sınıfları) temel alınarak alt bölümlere ayrılır. Daha kapsamlı biyokimyasal özelliklerine göre günümüzde sadece 2 fonksiyonel alt grup (3a ve 3b) tanımlanmaktadır. MBL'ların fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması Tablo-2'de gösterilmiştir.

Tablo-2: MBL'ların sınıflandırılması (28).

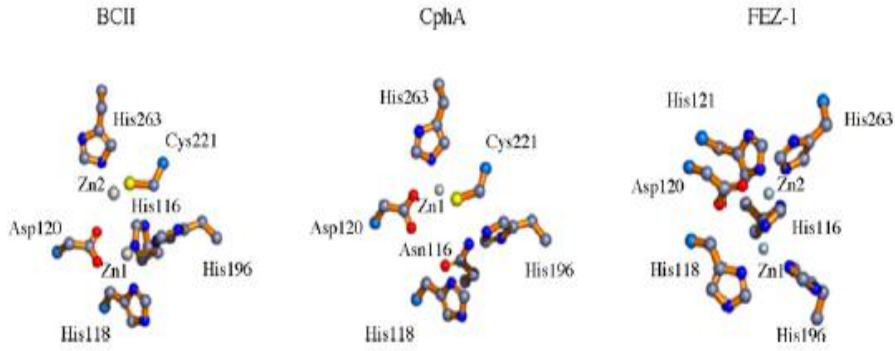
Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1

Alt grup 3a küresel olarak ortaya çıkan; sıklıkla nonfermentatif bakterilerde bulunan; IMP, VIM enzimleri gibi plazmidde kodlanan MBL ailelerini içerir. Bu enzimler yapısal olarak B1 alt sınıfında bulunur. Ayrıca *S. maltophilia*'daki L1 MBL ve CAU-1, GOB-1 ve FEZ-1 gibi alt sınıf B3 MBL'lar da bu gruba eklenmektedir. Bu enzimler, diğer alt grup 3a enzimlerinden çinko bağlamada yer alan aminoasit farklılıklarına göre ayrılırlar.

Alt grup 3b, penisilin ve sefalosporinlerin aksine tercihan karbapenemleri hidrolize eden daha küçük bir MBL grubunu içerir. Bu enzimler çinko bağlama alanlarının sadece biri dolduğunda karbapenemleri en etkin şekilde hidrolize ederler. MBL'ların diğer alt gruplarına göre ikinci bir çinko iyonunun varlığı enzimatik aktivitelerine inhibitör etkilidir (28).

Karbapenemler dahil beta-laktam antibiyotiklerin çoğunu hidrolize eden ve yapısal sınıflamaya göre B1 ve B3 alt sınıflarında bulunan

enzimlerde aktif alan 2 çinko iyonu içerir. B2 alt sınıfının üyelerinde ise daha sınırlı substrat özgüllüğünü açıklayacak şekilde sadece 1 çinko iyonu bulunur (3). B1, B2 ve B3 alt sınıflarında bulunan enzimlerin aktif alanları Şekil-1’de şematize edilmiştir.



Şekil-1: Alt sınıf B1 (BcII), B2 (CphA) ve B3 (Fez-1) beta-laktamazların çinko bağlama bölgeleri (2).

Sınıf B1’de yer alan enzimler çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde 3 histidin ve 1 sistein aminoasiti içerirler. Bu grupta IMP, VIM, GIM ve SPM-1 gibi transfer edilebilen enzimler yer almaktadır. B1 enzimleri arasında %23’ten fazla benzerlik bulunduğu gösterilmiştir.

Sınıf B2’de bulunan enzimler sadece karbapenemleri etkin bir şekilde hidrolize eder, penisilinler ve sefalosporinlere zayıf etkilidirler. Bu enzimlerde sınıf B1 ve B3 enzimlerde korunmuş His116, asparajinle yer değiştirmiştir. *Aeromonas* türlerindeki bazı enzimler ve *Serratia fonticola* SFH-1 enzimi bu grupta bulunur. B2 enzimleri B1 enzimleriyle sadece %11 benzerlik gösterirler.

Sınıf B3’te yer alan L1 enzimi ise diğerlerinden farklı olarak tetramer özelliğindeki tek enzimdir (2). Bütün varyantlara yer verilmemekle birlikte MBL’ların yapısal sınıflandırması, bu enzimleri taşıyan suşlar ve saptandıkları yıllar Tablo 3’te belirtilmiştir.

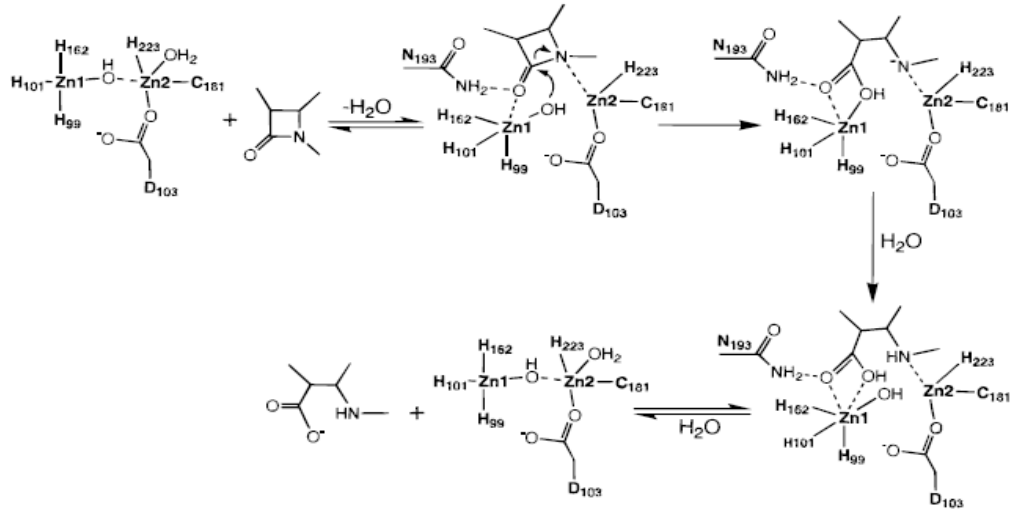
Tablo-3: MBL'lerin yapısal sınıflandırması (2).

Table 1 – Metallo-β-lactamases							
Subclass	Enzyme	Strain	Discovery in	GenBank accession no.	Accession no. (protein)	Structure	
B1	BclI	<i>B. cereus</i>	1966	M11189	AAA22276	Mono-zinc [48], Di-zinc [50], Apo-form [50]	
	CcrA	<i>B. fragilis</i>	1990	M63556	AAA22904	Di-zinc [49]	
	BlaB	<i>E. meningoseptica</i>	1998	AF189298	O08498	Di-zinc [52]	
	IND-1	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1999	EF394437	ABO21411		
	EBR-1	<i>E. brevis</i>	2002	AF416700	AAN32638		
	SFB-1	<i>Shewanella frigidimarina</i>	2005	AY590119	AAT90847		
	SLB-1	<i>Shewanella livingstonensis</i>	2005	AY590118	AAT90846		
	Acquired-B1	IMP-1	<i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	1994	S71932, AY168635	AAB30289, AAN87168	Di-zinc[51]
		VIM-1	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	1999	Y18050	CAE46717	
		VIM-2	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	2000	AF191564	AAK26253	Mono-zinc 1KO2, Di-zinc 1KO3
IMP-2		<i>A. baumannii</i> , <i>S. marcescens</i>	2000	AB182996	BAD26594		
SPM-1		<i>P. aeruginosa</i>	2002	AY341249	AAR15341	Mono-zinc [53]	
VIM-4		<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	2003	AY135661	AAR22402		
GIM-1		<i>P. aeruginosa</i>	2004	AJ620678	CAF05908		
SIM-1		<i>A. baumannii</i>	2005	AY887066	AA76774		
B2	CphA	<i>A. hydrophila</i>	1991	X57102	P26918	Mono-zinc [36]	
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i>	1996	Y01415	CAA71411		
	Sfh-1	<i>S. fonticola</i>	2003	AF197943	AAF09244		
B3	L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1991	AB294542	CAB75346	Di-zinc [22], Mono-zinc 2H6A, Apo-form 2FU6	
	GOB-1	<i>E. meningoseptica</i>	2000	AF090141	ABO21417		
	FEZ-1	<i>L. gormanii</i>	2000	Y17896	CAB96921	Di-zinc [54]	
	THIN-B	<i>J. lividum</i>	2001	AJ250876	CAC33832		
	Mbl1b	<i>C. crescentus</i>	2001	AJ315850	CAC48262		
	CAU-1	<i>Caulobacter vibrioides</i>	2002	AJ308331	CAC87665		
	BJP-1	<i>B. japonicum</i>	2006		NP_772870	Di-zinc 2GMN	

They are separated into the three subclasses and classified by year of discovery. All the variants are not included in this table.

Her alt sınıfın farklı MBL tipi vardır ve bunların çoğunun farklı allelik varyantları bulunur. Yeni bir MBL'in sınıflandırması için en az %30 aminoasit farklılığı eşik değer olarak kabul edilmektedir (3).

MBL'lerin biyokimyasal özellikleri: MBL'lar serin beta-laktamazlar gibi beta-laktam halkasındaki amid bağı kırarak antibiyotiği etkisiz hale getirirler. MBL'ların aktif bölgelerindeki çinko iyonları genellikle hidroliz için gerekli 2 su molekülünü bağlar. MBL'larda korunmuş ana motif His-X-His-X-Asp'dir. MBL'ların çoğunda 2 çinko iyonu bulunur, sınıf B2 enzimlerde ise tek çinko iyonu vardır. MBL'lar muhtemelen aktif bölgeleri ile beta-laktam bağı'nın polarizasyonunu sağlayarak çinkoya bağlı su moleküllerinin veya hidroksitlerin nükleofilik etkinliğini kolaylaştırmak suretiyle etkili olurlar (5). *B. fragilis*'e ait MBL'in muhtemel kataliz mekanizması Şekil-2'de gösterilmiştir.



Şekil-2: *B. fragilis* MBL'inin muhtemel kataliz mekanizması (30).

Bütün MBL'lar özgün bir $\alpha\beta\alpha$ kıvrımına sahiptir ve aktif alan üst üste katlanmıştır. Serin beta-laktamazların aksine MBL'larda geniş, esnek bir aktif alan oluşu bulunur ve bu nedenle beta-laktam substratların çoğuna uyum sağlarlar. Klavulanik asit ve sulbaktam gibi serin inhibitörlerinin engelleyici etkilerine de dayanıklıdırlar. MBL'ların hiçbiri aztreonamı iyi hidrolize edememektedir. Bu nedenle aztreonamın MBL inhibitörü olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (5). Ancak Bellais ve ark. (31) VIM-2 sentezleyen *P. aeruginosa* ile pnömoni oluşturdukları sıçanlarda aztreonamın etkinliğini araştırmışlar; yüksek dozlarda uygulandığında aztreonamın bakteri titresini azaltmakla birlikte enfeksiyonu eradike edemediğini saptamışlardır.

MBL'ların hidroliz mekanizması komplekstir, kıvrım ve aktif bölgelerinde ortak özellikler paylaşmalarına rağmen beta-laktam ajanlara bağlanma ve onları hidrolize edebilme yetenekleri değişkenlik gösterir. Yapısal olarak çok benzeyen VIM-1 ve VIM-2 enzimleri arasındaki fark buna iyi bir örnektir. VIM-2 benzilpenisilin, ampisilin, piperasilin, mezlosilin, tikarsilin, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefpirom, moksalaktam ve meropenem VIM-1'e göre daha düşük afinite gösterir ancak imipenem için VIM-1'e göre yaklaşık altı kat daha yüksek afiniteye sahiptir. İki enzim arasındaki bu aktivite farkının, enzimlerin aktif bölgelerinin yakınındaki 224. pozisyonda histidin/tirozin değişimi ile 228. pozisyonda serin/arjinin değişiminden kaynaklandığı öne sürülmüştür (5).

MBL'lar bazı bakteri türlerinde kromozomal yapının parçası olan genler tarafından (kromozomal MBL'lar) ya da horizontal gen transferi ile kazanılan heterolog genler (kazanılmış MBL'lar) tarafından kodlanırlar (3).

Kromozomal MBL'lar: Bazı bakteriler özellikle çevrede bulunanlar sıklıkla MBL taşımaktadırlar. Bunun nedeni bakterilerin zamanla beta-laktam / beta-laktam türü bileşiklere maruz kalarak bu genleri / ürünlerini kazanmaları ile açıklanabilir. Bu enzimlerin henüz bilinmeyen normal hücrel fonksiyonlarının bulunması da bir başka neden olabilir.

Kromozomal MBL sentezleyen bakterilere örnek olarak *Bacillus cereus* (BCII), *S. maltophilia* (L1), *A. hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB veya GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), *Myroides* türleri (TUS-1, MUS-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Serratia fonticola* (SFH-1) ve *Bradyrhizobium japonicum* (BJP-1) verilebilir. Kromozomal MBL genlerinin bir kısmı indüklenebilir özelliktedir. Bu enzimleri sentezleyen mikroorganizmalar fırsatçı patojenlerdir; *S. maltophilia* ve *Bacillus anthracis* dışında ciddi enfeksiyonlara neden olmazlar; çoğu beta-laktamlara yüksek düzeyde dirençlidirler.

Genellikle belirli bir tür ya da cins içindeki kromozomal MBL'lar çok değişkenlik göstermezler ve sıklıkla serin beta-laktamazlarla birlikte bulunurlar. Örneğin *A. hydrophila* bir penisilinaz, bir sefalosporinaz ve bir MBL üretir. Yüksek düzeyde beta-laktam direncine sahip *S. maltophilia*'nın da L1 MBL ve kromozomal sınıf A L2 enzimi bulunur (5).

Alt sınıf B2 enzimlerini kodlayan genler kromozom üzerinde yerleşmiştir ve ekspresyonları besiyerindeki beta-laktam antibiyotiklerin varlığı ile indüklenebilir.

Alt sınıf B3 MBL'lar da genellikle kromozomda kodlanırlar. L1'i kodlayan gen kromozomda ya da büyük bir plazmid üzerinde olabilir. Bu beta-laktamazın üretimi besiyerindeki beta-laktam antibiyotiklerin varlığı ile indüklenir (2).

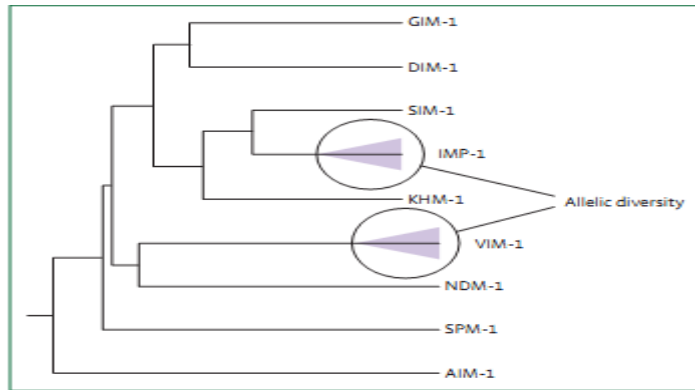
Kazanılmış MBL'lar: Kazanılmış MBL'ların kaynağı bilinmemektedir. En olası kaynak çevredeki bakterilerdir. Klinikte kazanılmış MBL genlerine

sahip suşların, antimikrobiyal ajanlara maruziyet sonucu seçilerek sağlık kurumlarının ikincil rezervuar oluşturabileceği düşünülmektedir.

Gram negatif patojenler arasında kazanılmış MBL'ların yayılımı mobil DNA elemanları aracılığıyla olmaktadır. Kazanılmış genlerin çoğu tip 1 veya tip 3 integronlarda gömülü mobil gen kasetleri üzerinde taşınır, bu nedenle integron rekombinasyonu ve integronlarla ilişkili DNA elemanları (transpozonlar ve plazmidler) MBL'ların yayılmasında önem taşır (3).

İnsersiyon sekansı ortak bölgeleri (ISCR) birçok antibiyotik direnç geninin yayılımıyla yakından ilişkisi olan yeni genetik elemanlardır ve *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium patojenite adaları ile de ilişkilidir. *blaIMP-1*'e sahip bir *P. aeruginosa* izolatında ISCR2 ve *blaVIM-1*'e sahip iki *P. aeruginosa* suşunda ISCR3 bulunmuştur (2). *blaSPM-1* ISCR ailesinin üyesi olan ve komşu DNA segmentlerini harekete geçirebilen ISCR4 ile ilişkili bulunmuştur. *blaNDM-1* ise farklı insersiyon sekanslarıyla ilişkili bulunmuştur. MBL gen kasetlerini içeren integronların çoğu farklı antibiyotik sınıfları (örneğin aminoglikozidler, kloramfenikol), dezenfektanlar veya diğer beta-laktamaz genlerinin direnç faktörlerini taşıyan ek gen kasetlerini barındırabilir. Bu yüzden integron transferi kompleks, çoklu ilaç direnç fenotipinin tek aşamada gerçekleşmesine neden olabilir.

En az 9 farklı kazanılmış MBL tanımlanmıştır. Epidemiyolojik dağılım ve klinik ilişkisi açısından en önemlileri IMP, VIM, SPM ve NDM enzimleridir (3). Kazanılmış MBL'lara ait dendogram Şekil-3'te gösterilmiştir.



Şekil-3: Kazanılmış MBL'lara ait dendogram (3).

IMP tipi MBL'lar: IMP tipi enzimler ilk defa 1988 yılında Japonya'da *P. aeruginosa* izolatında saptanmış (32); aynı gen 3 yıl sonra yine Japonya'da idrar yolu enfeksiyonundan izole edilen *S. marcescens* suşunda bulunmuştur (33). Bundan 2 yıl sonra yakın bir hastanede yine *S. marcescens* suşunda saptanan aynı IMP-1 allelinin (*blaIMP*), büyük bir plazmid üzerinde sınıf 3 integron içinde bulunduğu bildirilmiştir (34).

Japonya'nın farklı coğrafi bölgelerinde yapılan çalışmalarda *blaIMP-1* geninin *S. marcescens* ve *P. aeruginosa* izolatlarının yanı sıra *Alcaligenes xylosoxidans*, *P. putida / fluorescens*, *A. baumannii*'de de bulunduğu gösterilmiştir (35-37).

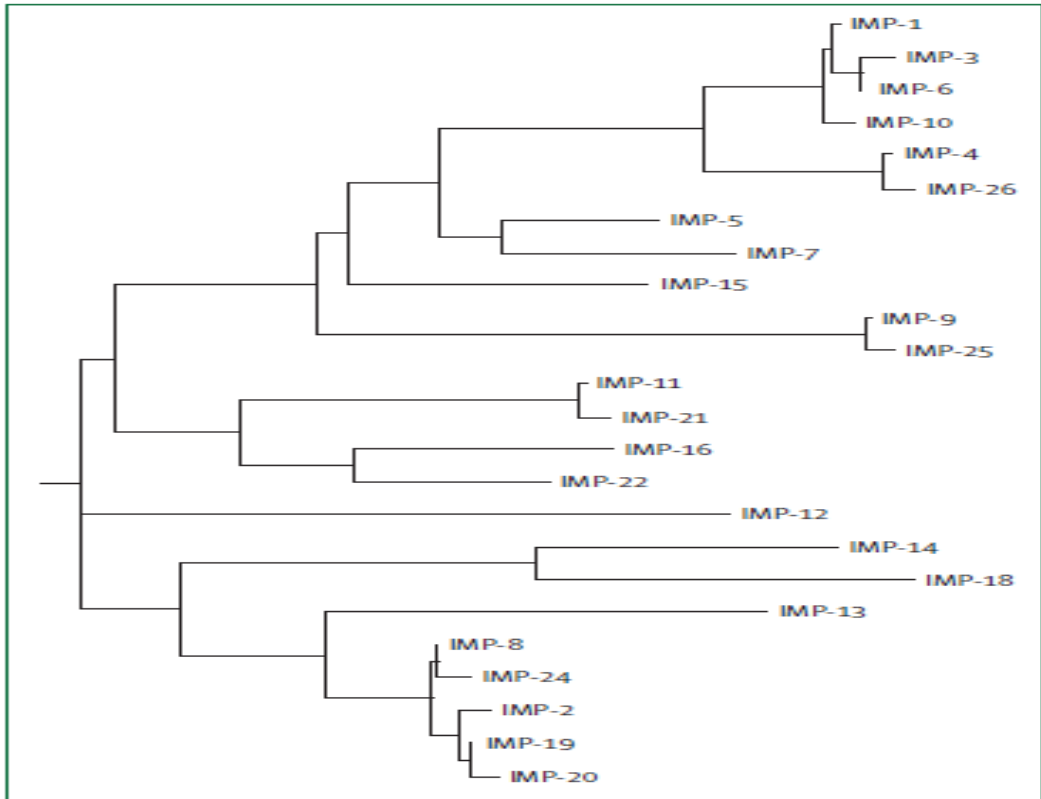
IMP-1'in 3 minör varyantı (IMP-3, IMP-6 ve IMP-10) da Japonya kökenli çalışmalarda identifiye edilmiştir. *Shigella flexneri* suşundan elde edilen IMP-3'ün IMP-1'den sadece 2 aminoasit farklı olduğu; 196. pozisyonda glisin yerine serin eklenmesinin penisiline karşı aktivitede azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (38). Aynı değişiklik IMP-1'e göre meropenemi imipenemden daha fazla hidrolize eden IMP-6'da da bulunmuştur (39). *blaIMP-10* geni *blaIMP-1* geninden 49. pozisyonda valin yerine fenilalanin gelmesi ile ayrılmaktadır. Bu baz değişikliği penisilin hidrolizinde azalmaya neden olmaktadır (40).

Hong Kong'da imipenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarında saptanan IMP-4'ün IMP-1'den 10; IMP-2'den 37 aminosit farklı olduğu bildirilmiştir (41).

Mobil MBL'ların sadece Japonya'nın sorunu olmadığı; İtalya'da çok ilaca dirençli bir *A. baumannii* suşunda (IMP-2); Portekiz'de nozokomiyal *A. baumannii* izolatında (IMP-5); Kanada'da klonal *P. aeruginosa* salgınında (*blaIMP-7*); Tayvan'da *K. pneumoniae* suşunda aminoglikozid direnç geninin bulunduğu integronda (*blaIMP-8*); Çin'de *P. aeruginosa* suşunda (*blaIMP-9*); İtalya'da izole edilen *Pseudomonas* türlerinde (IMP-12) ve Güney İtalya'da çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* ile meydana gelen nozokomiyal epidemide (IMP-13) farklı IMP tipi enzimler saptanmıştır (42-48).

IMP-1 ile karşılaştırıldığında; IMP-2'nin 36, IMP-5'in 17, penisiline karşı hidrolitik aktivitesinde azalma bulunan IMP-12'nin 36, IMP-13'ün ise 19 aminoasit farklı olduğu gösterilmiştir.

Dünyada çoğunluğunu *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinin oluşturduğu nonfermentatif gram negatif bakteriler ile *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinde 20'den fazla farklı IMP allotipi tanımlanmıştır (49-51). IMP allotiplerine ait dendogram Şekil-4'te gösterilmiştir.



Şekil-4: IMP tipi enzimlerin allelik varyantlarına ait dendogram (3).

Bazıları (örn: IMP-1, IMP-4 ve IMP-7) farklı coğrafi bölgelerde saptanmakla birlikte IMP varyantlarının sıklıkla belirli bir coğrafi dağılımı vardır. IMP tipi enzimler sefalosporinler ve karbapenemlere yüksek afinite gösterirler ancak temosiline (klinik önemi olmayan 6- α -metoksi penisilin) karşı aktiviteleri düşüktür. Çeşitli substratlar için IMP varyantları arasında önemli kinetik farklar bulunmakla birlikte bunun kliniğe yansması önemli görünmemektedir (3).

VIM tipi MBL'lar: VIM-1 İtalya'nın Verona şehrinde 1997 yılında izole edilen; piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam dahil beta-laktam antibiyotiklere dirençli bir *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır. VIM-1 geni de diğer *blaIMP* genleri gibi sınıf 1 integron içindeki bir gen kasetinde bulunmuş, bu integronda aminoglikozid direncini kodlayan bir gen kasetine de rastlanmıştır (52). Daha sonra Verona'da aynı hastanede *Achromobacter xylosoxidans*'ta; yine İtalya'da nozokomiyal enfeksiyon etkeni *P. putida*'da; Yunanistan'da *K. pneumoniae* suşlarında ile *E. coli* izolatında; Fransa'da GSBL SHV-5 pozitif *K. pneumoniae*'de; Macaristan ve İsveç'te izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında; Türkiye'de CTX-M-15 üreten çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* izolatında da VIM-1 bulunduğu bildirilmiştir (53-59).

VIM-2 ilk olarak Fransa'da imipenem tedavisi uygulanan pansitopenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir. VIM-1 ile aminoasit yapısı (%90) ve etki spektrumu benzerlik göstermektedir (60). VIM-2 üreten *Pseudomonas* izolatları Şili, Venezuela gibi Latin Amerika ülkeleri ile Hindistan, Rusya, Amerika, Sırbistan, Gana ve Kenya gibi değişik coğrafi bölgelerden bildirilmiştir (61-65). Bu enzim *C. freundii*, *S. marcescens*, *E. cloacae* gibi bakterilerde de saptanmıştır (5).

VIM-2'den 2 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-3 ise Tayvan'da *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır (66).

VIM-4 ilk defa 2001 yılında Yunanistan'da imipenem tedavisi uygulanan bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda raporlanmıştır. VIM-1'den bir aminoasit değişikliği ile ayrılır (67). Aynı enzim Mayıs 2002'de İtalya'da karbapenem ile tedavi edilen bir hastanın *E. cloacae* ve *K. pneumoniae* izolatlarında da saptanmıştır. Bu olguda VIM-4 aynı plazmid tarafından kodlandığı halde izolatların karbapenem için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) düzeylerinin çok farklı olduğu bildirilmiştir (68). VIM-4'ün Polonya'da *P. aeruginosa* suşlarında saptandığı; Fransa'da *C. freundii* izolatında NDM-1 ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir (69, 70).

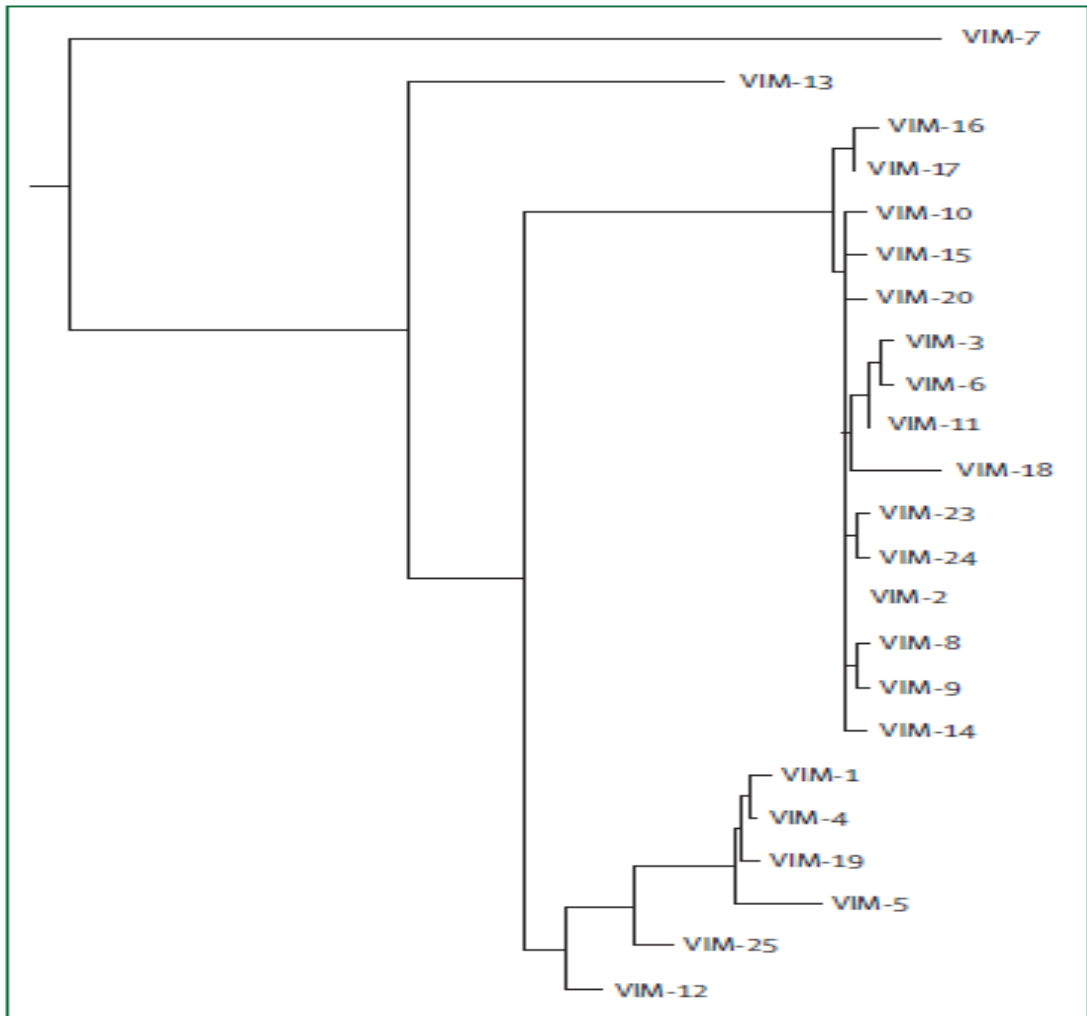
VIM-1'den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-5, Türkiye'de *K. pneumoniae* ve aztreonama dirençli *P. aeruginosa* suşlarında tanımlanmıştır (4, 71).

VIM-6, IMP-1'le birlikte Singapur'da beta-laktamlara yüksek düzeyde dirençli iki *P. putida* izolatında saptanmıştır. VIM-2 ile iki, VIM-3 ile sadece bir aminoasit farkı bulunmaktadır (72).

VIM-7 Teksas'da karbapeneme dirençli bir *P. aeruginosa*'da gösterilmiştir. VIM-1 ile %77, VIM-2 ile %74 benzerlik göstermektedir (73).

VIM-8, VIM-9, VIM-10 ve VIM-11'in *P. aeruginosa* izolatlarında saptandığı farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74-77). VIM-11 ayrıca Tayvan'da *Acinetobacter* suşlarında da tanımlanmıştır (78).

VIM-12, VIM-13 ve VIM-14 ise Avrupa'da ilk olarak İtalya'dan bildirilmiştir. Günümüzde 3 altsoya ait 20'den fazla VIM allotipi bilinmektedir (3) (Şekil-5).



Şekil-5: VIM tipi enzimlerin allelik varyantlarına ait dendogram (3).

IMP tipi enzimler gibi VIM varyantlarının da belirli coğrafi dağılımı vardır. Aslında VIM-1 ve VIM-2'nin IMP tipi enzimlere göre dağılımı daha geniştir. VIM tipi enzimler ilk defa *P. aeruginosa* ve diğer nonfermentatif gram negatif bakterilerde saptanmış olmakla birlikte zamanla *Enterobacteriaceae* üyelerinde de ortaya çıkmış ve önemli sorun oluşturmuştur. IMP tipi enzimlerden daha geniş substrat özgüllüğü gösteren VIM tipi MBL'lar, 6- α -metoksi penisilinleri de hidrolize edebilirler. Ayrıca karbapenemlere yüksek afiniteleri nedeniyle MBL'lar içinde önemli bir konuma sahiptirler (3).

SPM-1 tipi MBL: SPM-1 1997 yılında Brezilya'da lösemili bir kız çocuğunun kanından izole edilen *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır. Etken aztreonam ve kolistin dışında gram negatif bakterilere etkili bütün antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. En fazla IMP-1 ile benzerlik (%35,5) gösterir (79). SPM-1'in karbapenemler, sefalosporinler ve penisilinleri içeren geniş bir substrat özgüllüğü vardır. Günümüze kadar bu enzimin büyük oranda Brezilya'ya ve *P. aeruginosa*'ya sınırlı olduğu gösterilmiştir. Bu durum farklı mobil genetik elemanlarla ilişkilendirilmiştir (3). Brezilya dışından bildirilen tek SPM-1, ilk tedavisi Brezilya'da yapılan İsviçre'deki bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır (80).

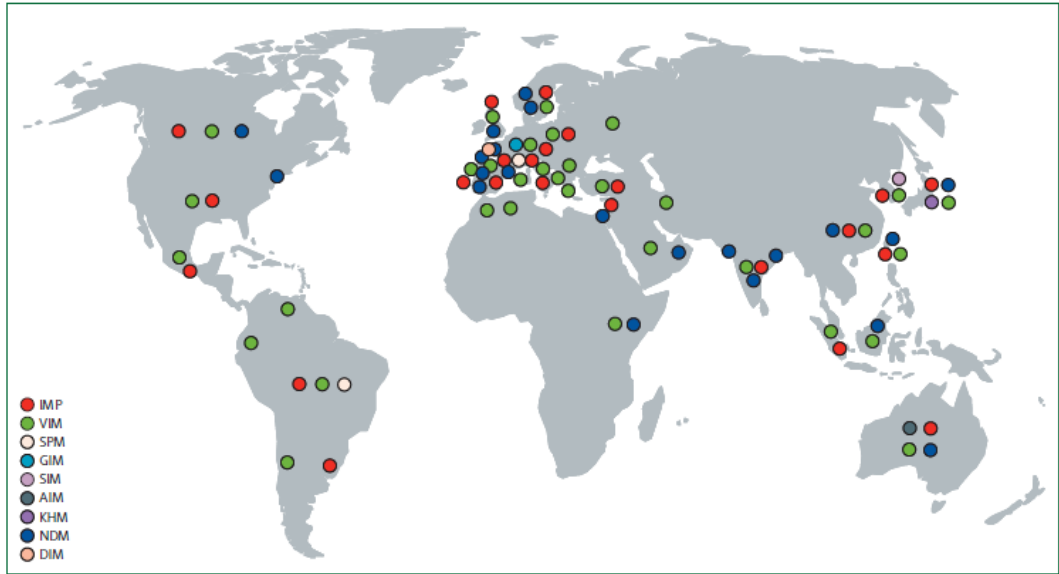
NDM-1 tipi MBL: Kazanılmış MBL'ların son üyelerinden olan NDM-1'in kıtalar arası yayılma eğilimi oldukça endişe vericidir. İlk defa Hindistan'dan İsveç'e dönen bir hastada 2008'de izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır. Aynı hastanın dışkı örneğinden izole edilen *E. coli* suşundaki plazmidde de *bla*NDM-1 bulunmuştur. Bu durum in vivo konjugasyon olasılığını akla getirmektedir. NDM-1 aztreonam hariç bütün beta-laktamları hidrolize edebilir. VIM-2 ile sadece %32,4 benzerlik göstermektedir (81).

İlk olguyu takiben, Birleşik Krallık'ta Hint asıllı bir hastanın kan kültüründen izole edilen *E. coli*'de (82); Amerika Birleşik Devletleri'nde Hindistan'da tedavi uygulanan hastaların *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*) izolatlarında (83); Yeni Delhi'de üç olgudan izole edilen *A. baumannii* suşlarında (84) NDM-1 saptanmıştır. NDM-1 içeren *Enterobacteriaceae* türleri arasında *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*,

Proteus spp., *C. freundii*, *K. oxytoca*, *M. morgani* ve *Providencia* spp.'nin bulunduğu; çoğunun kolistin ve tigesikline duyarlı olduğu bildirilmiştir (85). Ağustos 2010'dan beri Kanada, İsveç, Avusturya, Belçika, Fransa, Hollanda, Japonya, Afrika, Umman gibi diğer ülkelerden de NDM-1'in yayılımını gösteren raporlar yayınlanmaktadır (86). Hindistan yarımadasına ek olarak Balkanlar NDM-1 içeren suşların ikinci endemik bölgesi olabilir (3).

Bu enzimi kodlayan gen, bakteriler arasında kolaylıkla aktarılabilen farklı plazmidlerde bulunduğundan, değişik bakteri türleri arasında hızlı yayılım özelliği göstererek; *Enterobacteriaceae* üyeleri için de yüksek risk taşımaktadır (86).

Yayılma hızları NDM-1'e göre daha düşük olan kazanılmış diğer MBL'ların (SIM-1, GIM-1, AIM-1 ve DIM-1) klinik etkilerinin de daha zayıf olduğu bildirilmiştir. Günümüze kadar tanımlanan MBL'ların dünyadaki dağılımı Şekil-6'da gösterilmiştir (3).



Şekil-6: MBL'ların dünyadaki dağılımı (3).

Deneyisel MBL inhibitörleri: MBL üreten bakteriler ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde beta-laktam / beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları etkili değildir ve henüz klinikte kullanılabilecek bir MBL inhibitörü bulunmamaktadır. Bu konuda iki ana problem vardır. MBL'ların aktif bölgeleri küçük varyasyonlarla birbirinden farklılık gösterdiğinden tek bir

inhibitör ajanın tüm enzimlere etkin olması oldukça zordur. Diğer bir problem de MBL'ların aktif bölge yapılarının, hücre fonksiyonlarında gerekli bazı memeli enzimlerine benzemesidir. Örneğin insan glioksalaz II enzimi, MBL'ların çinko bağlama bölgelerine yapısal benzerlik göstermektedir.

Bugüne kadar MBL inhibitörü olarak bazı bileşikler geliştirilmiş ve çeşitli MBL'lar üzerinde denenmiştir. Bu bileşikler arasında tiyoester türevleri, ketonlar, sülfonil hidrazonlar, süksinik asit türevleri, penisilinat sülfon, bifenil tetrazoller, sefotetan, merkaptokarboksilat ve 1-beta-metil-karbapenem sayılabilir. Her biri farklı MBL'lar üzerine denendiği için bileşiklerin aktivitelerini karşılaştırmak zordur (5).

MBL'ların saptanması: MBL enzimlerinin varlığının araştırılması için günümüzde standardize edilmiş herhangi bir fenotipik yöntem bulunmamaktadır. Bütün MBL'lar aktif bölgelerindeki çinkonun uzaklaştırılmasından etkilendikleri için bu özelliğe dayanarak pek çok araştırma yapılmıştır. MBL'ları belirlemek için yapılan fenotipik testlerde substrat olarak genellikle imipenem veya seftazidim, şelatör ajan olarak da çoğunlukla EDTA kullanılmaktadır. MBL'ların çeşitli bileşiklerle inhibe olma düzeyleri ve imipenem veya seftazidime direnç durumları farklılık göstermektedir. Örneğin *Pseudomonas*'ların *Enterobacteriaceae* üyelerine göre karbapenem MİK'leri daha yüksektir ve MBL genine sahip olmasına rağmen çoğu *Enterobacteriaceae* ve bazı *Acinetobacter* türleri karbapeneme duyarlı görünebilir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde MBL araştırması için kullanılan; EDTA içeren ve içermeyen seftazidim diskleri arasındaki zon çapı farkının ölçüldüğü testler, sadece GSBL oluşturmeyen bakterilerde güvenilir sonuçlar vermektedir. Sonuç olarak fenotipik metotların sonuçları uygulanan yöntemle, test edilen bakteri cinsine, kullanılan beta-laktam substrata ve MBL inhibitörüne bağlı olarak uyumsuzluk gösterebilmekte; bütün transfer edilebilir MBL'ları saptayacak uygun bir inhibitör+beta-laktam kombinasyonu bulunmamaktadır.

Fenotipik testler arasında kombine disk testi, Etest, mikrodilüsyon testi ve karbapenem hidrolizi sayılabilir. Moleküler olmayan bu yöntemler içinde altın standart, bakteri hücre ekstraktlarının karbapenemleri hidrolize

etme yeteneğinin ve bu hidrolizin EDTA duyarlı olduğunun gösterildiği hidroliz testidir.

MBL tanısında fenotipik yöntemlere göre daha duyarlı olan genotipik yöntemler de kullanılabilir. Bu yöntemler arasında PCR, DNA problama, klonlama ve sekans analizi yer almaktadır. PCR ve DNA problama duyarlı yöntemler olmakla birlikte var olan varyantın tipini belirleyemezler. Burada devreye altın standart moleküler yöntemler olan klonlama ve sekans analizi girer; ancak bu testler de klinik laboratuvarların çoğunda rutin olarak yapılmamaktadır (5).

Tedavi

MBL üreten suşlar genellikle kompleks, çoklu direnç paternine sahiptirler; oluşturdukları enfeksiyonlarda mortalite artışı dikkati çeker. CLSI ve European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) karbapenem için saptanan MİK değerlerinin, klinik yönlendirme için yeterli olduğunu bildirmektedir. Ancak MİK'leri duyarlı aralıkta bulunan karbapenemlerin, MBL üreten bakteri enfeksiyonlarının tedavi başarısı hakkında endişeler bulunmaktadır (3).

MBL üreten suşlarda aminoglikozid ve kinolonlara karşı direnç de yaygın olduğu için geriye tigesiklin ve kolistin gibi çok az terapötik seçenek kalmaktadır. Maalesef kolistinin yaygın olarak amprik kullanılması *K. pneumoniae* gibi kolistine dirençli bakteri türlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. *P. aeruginosa*'ya karşı etkisiz olan tigesiklinin kan dolaşımı enfeksiyonlarında kullanımı sırasında ise düşük serum konsantrasyonları nedeniyle dikkatli olunması gerektiği bildirilmiştir (3). MBL tedavisinde diğer ajanlara fosfomisin eklenmesinin terapötik bir seçenek olabileceği bir meta-analiz çalışmasında raporlanmıştır (87).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05 Haziran 2012 tarih ve 20012-12/11 sayılı karar no ile izin alındı.

Bakteriler

Çalışmaya Haziran 2011 – Haziran 2012 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilen klinik örneklerden izole edilen; Phoenix (Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri) otomatize bakteri tanımlama ve duyarlılık test sisteminin NMIC/ID-99 ve UNMIC/ID-83 panellerinde identifiye edilen; imipenem (IMP) ve/veya meropenem (MRP) CLSI kriterlerine göre dirençli bulunan 35'i *Pseudomonas* spp., 35'i *Acinetobacter* spp. olmak üzere toplam 70 izolat dahil edildi. Aynı hastanın tekrarlayan izolatları çalışmaya alınmadı.

Pozitif kontrol olarak fenotipik ve moleküler testlerle daha önce MBL ürettiği belirlenmiş, VIM-1 tipi enzime sahip *P. aeruginosa* ile IMP-1 ve NDM tipi enzime sahip *K. pneumoniae* suşları; standart suş olarak ise imipenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

Cihazlar

Phoenix otomatize bakteri tanımlama ve duyarlılık test sistemi (Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri)

Termal döngü cihazı (Biometra, Almanya) (DNA izolasyonu için)

Termal döngü cihazı (ESCO Swift Max Thermal Cycler, Amerika Birleşik Devletleri) (DNA amplifikasyonu için)

Elektroforez tankı (BioRad MINI-SUB^R Cell GT, Amerika Birleşik Devletleri)

Elektroforez tankı güç kaynağı (BioRad Power PAC 300, Amerika Birleşik Devletleri)

UV transilüminatör (Major Science UV Transilluminator, Amerika Birleşik Devletleri)

Derin dondurucu -20°C (Bosch, Almanya)

Derin dondurucu -86°C (MDF-U72V, Sanyo, Japonya)

Etüv (Nüve EN 120, Türkiye)

Mikrodalga fırın (Arçelik intellowave, Türkiye)

Spektrofotometre (Thermo NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, Amerika Birleşik Devletleri)

Nefelometre cihazı (CrystalSpecTM, Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri)

Otoklav (Nüve OT 4060 V, Türkiye)

Elektronik tartı (Shimadzu AUW220 D, Japonya)

Soğutmalı santrifüj (Hermle Z216MK, Almanya)

Medikal su arıtma cihazı (RentRO 2000, Kros, Türkiye)

Manyetik karıştırıcı (Boeco MSH 200, Almanya)

Besiyerleri ve Çözeltiler

Colombia agar besiyeri (Becton Dickinson, BBL, Almanya)

(%5 koyun kanı içeren kullanıma hazır besiyeri)

Mueller Hinton agar (MHA) besiyeri (Oxoid, İngiltere)

MHA besiyerinin hazırlanışı:

Üretici firmanın önerisine göre 38 g toz besiyeri 1 litre distile suda eritildi, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 9 cm çapında steril plastik petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü. Modifiye Hodge testi, Etest, çift disk sinerji testi ve kombine disk testi uygulamaları için kullanıldı.

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, Almanya)

0.5 M EDTA stok çözeltisinin hazırlanışı:

Kombine disk testi ve çift disk sinerji testi uygulamaları ile agaroz jel hazırlığında kullanılan bu çözelti için 1 litre distile suda 186.1 g EDTA eritildi, NaOH ile pH 8.0'e ayarlandı.

Tris-base (Sigma-Aldrich, Almanya)

Borik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)

10xTris-Borik asit-EDTA (TBE) stok tampon çözeltisinin (pH:8.4) hazırlanışı:

Tris-base (108 g), borik asit (55 g) ve 0.5 M EDTA stok çözeltisi (40 mL) üzerine toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ilave edildi, manyetik karıştırıcıda eritildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi. Agaroz jel hazırlamak için 0.5xTBE kullanıldı. Bu amaçla 50 mL 10xTBE tampon çözeltisi 950 mL distile su ile karıştırıldı.

Diğer Malzemeler

Burgulu, kapaklı steril tüp (15 mL) (Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri)

Mikrobank (Mast Diagnostics, Almanya)

Ependorf tüpü (1.5, 0.5 ve 0.2 mL) (AHN Biotechnologie GmbH, Almanya)

Mikropipet (10, 100, 1000 µL) (Gilson, Amerika Birleşik Devletleri)

Steril eküviyon (Citoswab, Çin)

Steril petri kutusu (90 mm çapında) (Fıratmed, Türkiye)

IMP diski 10 µg (Oxoid, İngiltere)

Seftazidim (CAZ) diski 30 µg (Oxoid, İngiltere)

Boş disk (Oxoid, İngiltere)

Ettest MBL şeridi (Bir ucunda 4-256 µg/mL IMP, diğer ucunda 1-64µg/mL IMP+EDTA içeren) (Biomerieux, Fransa)

2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) (Merck, Almanya)

Taq polimeraz (Fermentas, Amerika Birleşik Devletleri)

dNTP karışımı 10 mM (Bio Basic Inc., Kanada)

10x PCR tamponu (Fermentas, Amerika Birleşik Devletleri)

MgCl₂ 2.5 mM (Fermentas, Amerika Birleşik Devletleri)

DNA markerı (Bio Basic Inc., DNA 100 bp Ladder Marker, Kanada)

MBL primer seti (4 çift) (Genmar Diagnostic Company, Türkiye)

Yükleme tamponu (Bio Basic Inc., Kanada)

Agaroz (Agarose low EEO, AppliChem, Almanya)

Parafilm M 4" x 125' (Pechiney Plastic Packaging Inc., Şikago)

Çalışmaya alınan suşların saf kültürlerinden steril eküviyonla bol miktarda alınarak mikrobank saklama tüplerinde yoğun bakteri süspansiyonları hazırlandı. Mikrobank tüpleri çalkalanarak süspansiyon içindeki bakterilerin tüplerin içerisinde yer alan adsorban boncuklarla temas etmesi sağlandı. Daha sonra tüplerin içindeki sıvılar aspire edilerek çalışma yapıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çalışma öncesi saklanan suşların mikrobank tüplerinden %5 koyun kanlı Colombia agara pasajları yapıldı. Saf kültürler aerop koşullarda, 35°C'de, 18-24 saatlik inkübasyon sonucu elde edildi.

Fenotipik Yöntemler

Modifiye Hodge Testi (MHT)

Hodge testi aslında penisilinaz üreten *Neisseria gonorrhoeae*'yi tespit etmek için geliştirilmiş bir yöntemdir (88). Bu test MBL varlığının gösterilmesi için penisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 yerine *E. coli* ATCC 25922 standart suşu ve 10 U penisilin diski yerine 10 µg IMP diski kullanılarak modifiye edilmiştir ve MHT olarak adlandırılmıştır (89).

Yapılışı:

1. Standart *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonu 10 kat sulandırılarak steril eküviyon yardımıyla MHA besiyerinin tüm yüzeyine inoküle edildi.
2. Petrinin ortasına bir adet IMP diski yerleştirilerek test edilecek 3 bakteri ve pozitif kontrol olarak IMP-1 pozitif *K. pneumoniae* suşu disk kenarından periferine doğru çizgi şeklinde yoğun olarak ekildi.
3. Aerob koşullarda 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası *E. coli*'ye ait inhibisyon zonunda görülen bozulma MBL pozitif olarak değerlendirildi.

Etest Yöntemi

1. Test edilecek bakterinin 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu steril bir eküviyon yardımıyla MHA besiyerinin tüm yüzeyine yayıldı.
2. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben bir ucunda IMP (4-256 µg/mL), diğer ucunda IMP (1-64 µg/mL)+EDTA içeren Etest şeridi besiyeri yüzeyine yerleştirildi.
3. Aerob koşullarda 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası birbirine zıt yönde oluşan iki elipsin şeritle kesiştiği noktalara denk gelen MİK değerleri belirlendi ve birbirine oranlandı.
4. IMP MİK değerinin IMP+EDTA MİK değerine oranınının 8 ve üzeri olması (IMP MİK değerinin EDTA varlığında 3 log2 dilüsyon ve üzerinde azalması) MBL pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca Etest şeridinin IMP veya EDTA içermeyen orta bölümünde "fantom zon" (hayalet bölge) olarak adlandırılan görüntünün izlenmesi de MBL pozitif olarak yorumlandı.

Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Bu testin temeli, değişik beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan inhibisyon zonunun çeşitli metal şelatörler varlığında genişlemesi veya "fantom zon" oluşması mekanizmasına dayanmaktadır (90).

Yapılışı:

1. Test edilecek bakterinin 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu steril bir eküviyon ile MHA besiyerinin yüzeyine yayıldı.
2. Besiyerinin kurummasını takiben *Pseudomonas* izolatları için CAZ diski ve boş disk, *Acinetobacter* izolatları için IMP diski ve boş disk aralarında merkezden merkeze 2 cm uzaklık olacak şekilde MHA besiyeri üzerine yerleştirildi.
3. Boş diske 5 µL 2-MPA emdirildi.
4. Aerob şartlarda 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası diskler arasında artmış inhibisyon zonu veya fantom zon görülmesi MBL pozitif olarak değerlendirildi.

Boş diskte bulunan 2-MPA'nın (5 µL) *Pseudomonas* türlerinin üremesini fazla inhibe ettiği ve testin değerlendirilmesini zorlaştırdığı tespit edildiğinden bu bakteriler için 3 µL 2-MPA içeren diskler kullanılarak test tekrar edildi. Ayrıca *Pseudomonas* türleri için daha uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla birbirlerine uzaklığı merkezden merkeze 2 cm olacak şekilde IMP diski ve 10 µL 0.5 M EDTA emdirilen boş disk ile de ÇDST yapıldı.

5. Pozitif kontrol suşlarına aynı test prosedürü uygulandı.

Kombine Disk Testi (KDT)

1. Test edilecek suşların 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonları steril eküvyon yardımı ile MHA besiyerlerine yayıldı.
2. Besiyerinin kurummasını takiben *Acinetobacter* spp. için besiyeri üzerine kenarları arasında 1.5-2 cm mesafe olacak şekilde 2 adet IMP diski, *Pseudomonas* spp. için 2 adet CAZ diski yerleştirildi.
3. Disklerden birer tanesine 10 µL 0.5 M EDTA çözeltisi emdirildi.
4. Aerob şartlarda 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası EDTA emdirilmiş ve emdirilmemiş disklerin inhibisyon zon çapları ölçüldü. Aralarında 7 mm ve daha fazla fark bulunması MBL pozitif olarak değerlendirildi.
5. Pozitif kontrol suşlarına aynı test prosedürü uygulandı.

Moleküler Yöntemler

Çalışmaya alınan izolatlar PCR analizi ile *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSPM* ve *blaNDM* genleri yönünden PCR ile incelendi.

Primerlerin Seçilmesi ve Hazırlanması

Çalışmada epidemiyolojik yayılım ve klinik ilişki açısından önemli olan IMP, VIM, SPM ve NDM tipi enzimlerin genlerine yönelik 4 çift primer kullanıldı (3, 91). Primerlerin özellikleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo-4: MBL primerlerinin özellikleri (91).

Hedef	Primer	Sekans (5'- >3')	Amplikon uzunluğu (bp)
blaIMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAY*TCTC	232
	IMP-R	GGTTTAAY*AAAACAACCACC	
blaVIM	VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	390
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
blaSPM	SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271
	SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
blaNDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	

*Y = C ya da T

Liyofilize primerler üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak sulandırıldı. Önce 100 µM'lık stok çözeltiler, bu çözeltilerden 10 µM'lık porsiyonlar hazırlandı. Primerler kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

DNA İzolasyonu

1. Mikrobank tüplerinden %5 koyun kanlı Colombia agara aktarılarak canlandırılan bakterilerin ve MBL pozitif kontrol suşlarının (*blaIMP-1* pozitif *K. pneumoniae*, *blaNDM* pozitif *K. pneumoniae* ve *blaVIM* pozitif *P. aeruginosa*) MHA besiyerine pasajları yapıldı. Aerob şartlarda 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen saf kültürlerden distile su ile McFarland 4-5 bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.
2. Bakteri süspansiyonlarından 500 µL alınarak 0.5 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpleri -80°C'de 24 saat bekletildi, ardından bakteri süspansiyonlarının oda sıcaklığında iyice çözülmesi sağlandı.
4. Daha sonra ependorf tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek 99°C'de 15 dakika bekletildi.

5. Tüpler 11.000xg'de 4 dakika, +4°C'de santrifüj edildi.
6. Süpernatandan 200 µL alınarak 0.2 mL'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
7. Süpernatantların spektrofotometrede DNA kantitasyonu yapıldı.
8. Süpernatantlar amplifikasyon işlemine kalıp olarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

DNA Amplifikasyonu

***blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaSPM* genlerine yönelik PCR**

DNA amplifikasyonu her izolat için 0.2 mL'lik ependorf tüpünde, 25 µL PCR karışımında gerçekleştirildi. Her reaksiyon karışımı son hacimde 1xPCR tampon, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.3 µM her bir primer ve 2.5 U/100µL Taq polimeraz olacak şekilde distile su ile 23 µL'ye tamamlandı ve 2 µL DNA ekstraktı eklenerek son hacmin 25 µL olması sağlandı.

Ependorf tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek *blaIMP*, *blaNDM*, *blaSPM* genlerine yönelik DNA amplifikasyon döngüsü 94°C'de 10 dakika ilk denatürasyon; sonrasında 36 siklus boyunca 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 40 saniye bağlanma, 72°C'de 50 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi.

blaVIM genlerine yönelik DNA amplifikasyon döngüsü, 94°C'de 10 dakika ilk denatürasyon; sonrasında 36 siklus boyunca 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 40 saniye bağlanma, 72°C'de 50 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Elde Edilmesi

Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan ürünleri gösterebilmek amacı ile ampikonlar agaroz jel içerisinde elektrik akımına tabi tutuldu.

1. Elektroforez matrisi olarak kullanılmak üzere %2'lik agaroz jel hazırlanışı:

- a. Cam balonda 0.8 gr agaroz üzerine 40 ml 0.5xTBE ilave edildi.
- b. Homojenizasyon sağlanana kadar karışım mikrodalga fırında eritildi.
- c. Karışım oda sıcaklığında bekletilerek 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde soğutuldu.

- d. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/mL'lik etidyum bromid stok çözeltisinden 4 µL eklendi, karıştırıldı.
 - e. Hazırlanan agaroz jel, kenarları kapatılmış ve taracları uygun olarak yerleştirilmiş jel kaseti üzerine sızıntı ve kabarcık olmayacak şekilde yavaşça döküldü.
 - f. Jel kalıbı katılaşması için oda sıcaklığında 20-25 dakika bekletildi.
 - g. Jel kalıbı katılaştıktan sonra taraclar dikkatlice çıkarıldı ve kalıp elektroforez tankına yerleştirildi.
2. Parafilm üzerine her bir örnek (amplifikasyon ürünü), 1 adet DNA markerı ve 1 adet ilgili pozitif kontrol için 2'şer µL yükleme tamponu konuldu.
 3. Örnekler, DNA markerı ve pozitif kontrolden 10'ar µL alınarak parafilm üzerindeki yükleme tamponu ile karıştırıldı.
 4. Karışımlardan 10'ar µL alınarak jel kalıbı üzerindeki kuyulara aktarıldı.
 5. Tankın güç kaynağı 100 V akımda çalıştırılarak 1 saat süreyle elektroforez uygulandı.

PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

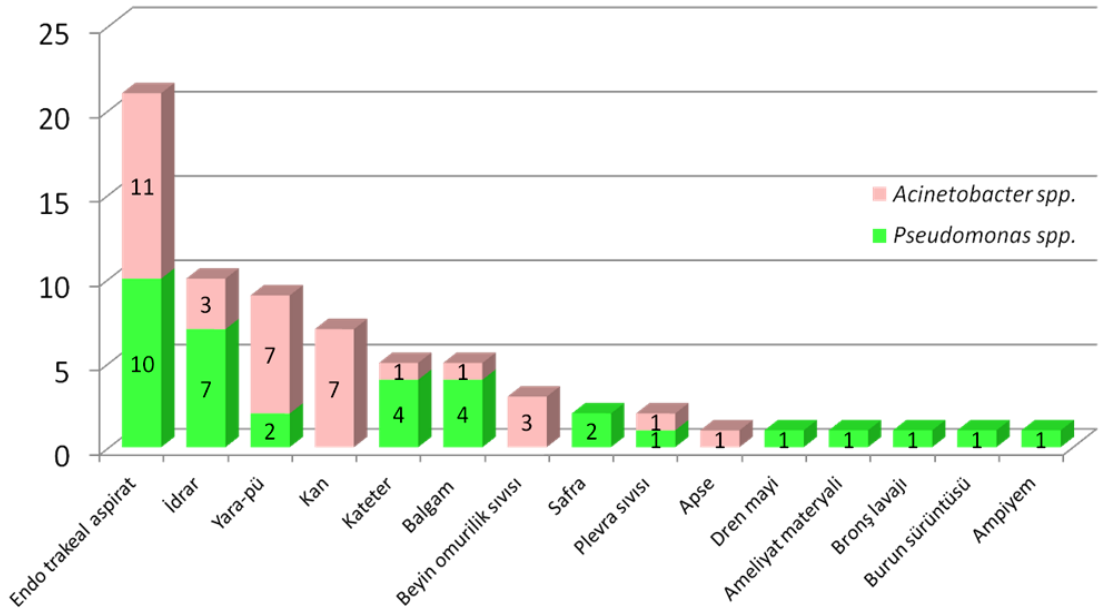
Elektroforez işlemi sonunda jel UV transilüminatör üzerine alındı. Burada UV ışığı (~304 nm) altında jelin dijital fotoğrafı çekildi. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, DNA markerı ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan imipenem ve/veya meropenem dirençli 70 izolatin 24'ü *A. baumannii*, 9'u *A. baumannii/calcoaceticus complex*, 2'si *Acinetobacter* spp., 32'si *P. aeruginosa*, 3'ü *P. putida* olarak tanımlanmıştır.

Acinetobacter ve *Pseudomonas* suşlarının izole edildikleri örnek tiplerine göre dağılımı Şekil-7'de gösterilmiştir. Endotrakeal aspirat (ETA) her iki mikroorganizmanın en sık izole edildiği örnek (n:21, %30) olup; bunu idrar (n:10, %4,3), yara-pü (n:9, %12,9) ve kan (n:7, %10) izlemektedir.

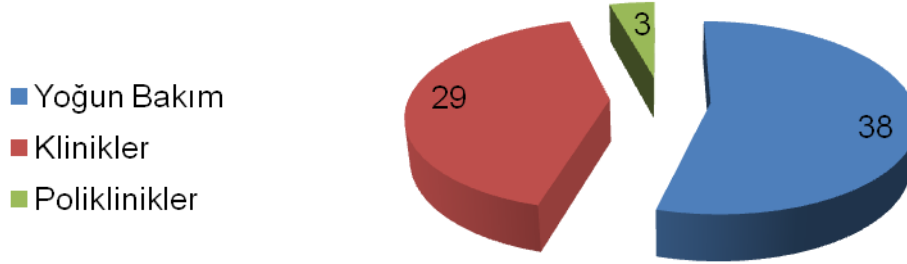
Acinetobacter izolatlarının örnek dağılımında ilk üç sırada ETA (n:11), kan ve yara-pü (n:7) ile beyin omurilik sıvısı (BOS) ve idrar (n:3) bulunmaktadır; *Pseudomonas* suşları için ise sıralamada ETA (n:10), idrar (n:7) ile kateter ve balgam (n:4) örnekleri yer almaktadır (Şekil-7).



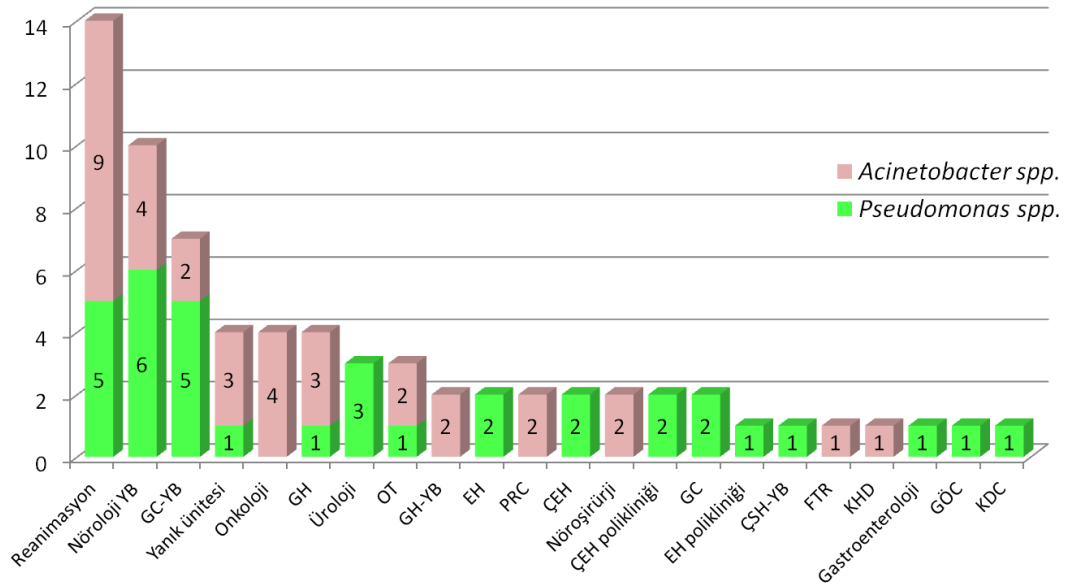
Şekil-7: Karbapenem dirençli *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının izole edildikleri örnek tiplerine göre dağılımı.

Büyük çoğunluğu (n:38, %54,2) Yoğun Bakım Üniteleri'nde takip ve tedavi edilen hastalara ait olan karbapenem dirençli *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının kliniklere göre dağılımında ilk üç sırada 4'er örnek

ile Onkoloji ve Göğüs Hastalıkları; 3'er örnek ile Üroloji, Ortopedi ve Travmatoloji; 2'şer örnek ile Enfeksiyon Hastalıkları, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları, Nöroşirürji ve Göğüs Cerrahisi klinikleri yer almaktadır (Şekil-8 ve Şekil-9).



Şekil-8: Yatarak ve ayaktan takip edilen hastalarda karbapenem dirençli *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının dağılımı.



Şekil-9: Karbapenem dirençli *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının kliniklere göre dağılımı.

YB: Yoğun Bakım
 GC: Genel Cerrahi
 GH: Göğüs Hastalıkları
 OT: Ortopedi ve Travmatoloji
 EH: Enfeksiyon Hastalıkları
 PRC: Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi

ÇEH: Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları
 ÇSH: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
 FTR: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon
 KHD: Kadın Hastalıkları ve Doğum
 GÖC: Göğüs Cerrahisi
 KDC: Kalp ve Damar Cerrahisi

Acinetobacter ve *Pseudomonas* izolatlarının antibiyogram sonuçları Tablo-5 ve 6'da gösterilmiştir.

Acinetobacter suşlarında %62,8 amikasin, %80 gentamisin, %88,5 sefepim, %91,4 trimetoprim-sülfametoksazol, %97,1 siprofloksasin, %100 imipenem, meropenem, seftazidim ve piperasilin-tazobaktam; *Pseudomonas* izolatlarında ise %11,4 amikasin, %45,7 siprofloksasin, piperasilin-tazobaktam, %51,4 sefepim, gentamisin, %54,2 seftazidim, %74,2 aztreonam, %85,7 imipenem, %88,5 meropenem direnci saptandı. *Pseudomonas* suşlarının 26'sında (%74,2) imipenem ve meropenem direnci birlikte bulundu.

Florokinolon ve aminoglikozit direncine sahip, beta-laktam grubu antibiyotiklerden (seftazidim, meropenem, imipenem, sefoperazon-sulbaktam) en az birine dirençli olan izolat, çoklu ilaç dirençli olarak kabul edildi. Buna göre 35 *Pseudomonas* izolatının 10'u (%28,5), 35 *Acinetobacter* izolatının 31'i (%88.5) çoklu ilaç direncine sahip olarak değerlendirildi.

Tablo-5: *Acinetobacter* izolatlarının MİK değerleri (µg/mL).

İZOLAT	Amikasin	Ampisilin-sulbaktam	Sefepim	Sefoperazon-sulbaktam	Sefotaksim	Seftazidim	Siprofloksasin	Kolistin	Gentamisin	İmpenem	Levofloksasin	Meropenem	Piperasilin-tazobaktam	Tetrasiklin	Trimetoprim sulfametoksazol
A1	>32 R	>16/8 R	>16 R	*	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A2	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A3	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A4	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A5	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	=8 I	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A6	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A7	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A8	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A9	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	=4 S	>4/76 R
A10	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A11	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A12	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A13	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	=8 I	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	≤2 S	>4/76 R
A14	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A15	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	=4 S	=2/38 S
A16	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	=8 I	>4/76 R
A17	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A18	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	=0.5 S	≤1 S	>8 R	>8 R	≤1 S	>8 R	>64/4 R	4 S	>4/76 R

R: Dirençli
S: Duyarlı
I: Orta derece duyarlı
*: Çalışılmadı

Tablo-5 (devamı): *Acinetobacter* izolatlarının MİK değerleri (µg/mL).

İZOLAT	Amikasin	Ampisilin-sulbaktam	Sefepim	Sefoperazon-sulbaktam	Sefotaksim	Seftazidim	Siprofloksasin	Kolistin	Gentamisin	İmipenem	Levofloksasin	Meropenem	Piperasilin-tazobaktam	Tetrasiklin	Trimetoprim sulfametoksazol
A19	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A20	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A21	=32 I	=16/8 I	=16 I	=32/8 R	=16 I	=32 R	>2 R	*	>8 R	>8 R	*	>8 R	>64/4 R	*	>4/76 R
A22	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	=2 S	>8 R	>64/4 R	≤2 S	=4/76 R
A23	=16 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A24	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A25	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	=4 S	=2/38 S
A26	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A27	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	=2 S	>8 R	>64/4 R	=4 S	>4/76 R
A28	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	=8 I	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A29	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	*	>16 R	>2 R	*	>8 R	>8 R	*	>8 R	>64/4 R	*	≤1/19 S
A30	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A31	>32 R	>16/8 R	=8 S	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A32	>32 R	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A33	≤8 S	>16/8 R	=16 I	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	=12 R	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A34	≤8 S	>16/8 R	>16 R	>32/8 R	>32 R	>16 R	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R	>8 R	>4/76 R
A35	≤8 S	>16/8 R	=16 I	>32/8 R	*	>16 R	>2 R	*	>8 R	>8 R	*	>8 R	>64/4 R	*	>4/76 R

R: Dirençli

S: Duyarlı

I: Orta derece duyarlı

*: Çalışılmadı

Tablo-6: *Pseudomonas* izolatlarının MİK değerleri (µg/mL).

İZOLAT	Amikasin	Aztreonam	Sefepim	Sefoperazon sulbaktam	Seftazidim	Siprofloksasin	Kolistin	Gentamisin	İmipenem	Levofloksasin	Meropenem	Pierasinin tazobaktam
P1	≤8 S	=8 S	>16 R	=32/8 I	>16 R	=0.25 S	≤1 S	>8 R	>8 R	=2 S	>8 R	=32/4 I
P2	>32 R	>16 R	>16 R	>32/8 R	=4 S	>2 R	*	>8 R	>8 R	>8 R	>8 R	=64/4 I
P3	≤8 S	>16 R	=16 I	=32/8 I	=8 S	=1 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	=4 I	>8 R	=32/4 I
P4	≤8 S	=16 I	=8 S	=16/8 S	=4 S	>2 R	*	=4 S	>8 R	*	=8 R	=8/4 S
P5	>32 R	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P6	≤8 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P7	≤8 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	=0.5 S	≤1 S	>8 R	>8 R	=2 S	>8 R	=32/4 I
P8	≤8 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	=1 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	=4 I	>8 R	>64/4 R
P9	≤8 S	>16 R	=16 I	=32/8 I	=8 S	=1 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	=4 I	>8 R	=16/4 S
P10	>32 R	>16 R	=16 I	>32/8 R	=8 S	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P11	≤8 S	>16 R	=8 S	>32/8 R	=8 S	≤0.5 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	=2 S	>8 R	=64/4 I
P12	=16 S	>16 R	=16 I	>32/8 R	=8 S	≤0.5 S	≤1 S	=8 I	>8 R	=2 S	>8 R	=32/4 I
P13	=16 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	≤0.5 S	≤1 S	>8 R	>8 R	≤1 S	>8 R	>64/4 R
P14	≤8 S	>16 R	=16 I	>32/8 R	>16 R	=2 I	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P15	=16 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	=2 I	≤1 S	=8 I	>8 R	=4 I	>8 R	>64/4 R
P16	=32 I	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P17	≤8 S	=8 S	=4 S	=8/8 S	=4 S	≤0.5 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	≤1 S	=8 R	=8/4 S
P18	=32 I	>16 R	>16 R	*	>16 R	=2 I	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R

S: Duyarlı
R: Dirençli
I: Orta derece duyarlı
*: Çalışılmadı

Tablo-6 (devamı): Pseudomonas izolatlarının MİK değerleri (µg/mL).

İZOLAT	Amikasin	Aztreonam	Sefepim	Sefoperazon sulbaktam	Seftazidim	Siprofloksasin	Kolistin	Gentamisin	İmpenem	Levofloksasin	Meropenem	Pierasinin tazobaktam
P19	≤8 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	=16 I	>2 R	≤1 S	=4 S	>8 R	>4 R	>8 R	=32/4 I
P20	>32 R	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P21	=32 I	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P22	=32 I	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	>8 R	>64/4 R
P23	≤8 S	≤2 S	≤1 S	=32/8 I	=2 S	≤0.125 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	≤1 S	>8 R	≤4/4 S
P24	≤8 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	≤0.5 S	*	>8 R	≤1 S	*	>8 R	>64/4 R
P25	≤8 S	=4 S	=4 S	=16/8 S	=4 S	≤0.5 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	≤1 S	=4 I	=8/4 S
P26	≤8 S	=8 S	=8 S	=16/8 S	=8 S	≤0.5 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	≤1 S	=4 I	=32/4 I
P27	≤8 S	>16 R	=16 I	>32/8 R	=8 S	>2 R	*	>8 R	≤1 S	*	>8 R	>64/4 R
P28	≤8 S	>16 R	=16 I	>32/8 R	=8 S	>2 R	*	>8 R	=2 S	*	>8 R	>64/4 R
P29	=32 I	>16 R	=16 I	>32/8 R	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	>4 R	=2 S	>64/4 R
P30	=16 S	>16 R	>16 R	>32/8 R	>16 R	≤0.5 S	*	>8 R	=4 I	*	>8 R	=16/4 S
P31	≤8 S	=4 S	=2 S	=8/8 S	=2 S	>2 R	≤1 S	≤2 S	>8 R	>4 R	=4 I	≤4/4 S
P32	≤8 S	=8 S	>16 R	>32/8 R	>16 R	=0.5 S	≤1 S	>8 R	=8 R	=2 S	>8 R	=32/4 I
P33	=16 S	>16 R	=16 I	=8/8 S	>16 R	>2 R	≤1 S	=8 I	=4 I	>4 R	>8 R	=64/4 I
P34	=32 I	>16 R	>16 R	=16/8 S	>16 R	>2 R	≤1 S	>8 R	>8 R	*	=8 R	=16/4 S
P35	≤8 S	=8 S	=2 S	=8/8 S	=2 S	≤0.125 S	≤1 S	≤2 S	>8 R	≤1 S	=8 R	≤4/4 S

S: Duyarlı

R: Dirençli

I: Orta derece duyarlı

*: Çalışılmadı

Acinetobacter suşlarının 29'unda (%82,8) Etest, 16'sında (%45,7) MHT, 14'ünde (%40) ÇDST, 5'inde (%14,2) KDT ile MBL varlığı saptandı. Etest ile MBL ürettiği belirlenen izolatların 13'ünde (%44,8) MHT ile de MBL pozitifliği gözlemlendi. Bu suşların sadece 4'ünde (%30,7) KDT ile 3'ünde (%23) ise ÇDST ile MBL varlığı saptandı. Tüm fenotipik testlerin birlikte MBL pozitifliği saptadığı hiçbir *Acinetobacter* suşuna rastlanmadı (Tablo-7).

Pseudomonas suşlarının 6'sında KDT (%17,1), 5'inde (%14,2) CAZ-MPA ÇDST, 4'ünde (%11,4) IMP-EDTA ÇDST, 2'sinde (%5,7) Etest, 1'inde (%2,8) MHT ile MBL varlığı saptandı. Etest ile imipenem MİK değeri <4 µg/mL bulunan 10 *Pseudomonas* izolatında değerlendirme yapılamadı. IMP-EDTA ÇDST, CAZ-MPA ÇDST ve KDT ile MBL pozitifliği saptanan 3 izolatın (P1,P7, P32) Etest sonuçları P7 ve P32 için pozitif, P1 için negatif bulundu (Tablo-8).

Tablo-7: Karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarının fenotipik ve genotipik test sonuçları.

İzolat no	Bakteri adı	Örnek alım yeri	Klinik	MHT	Etest	ÇDST IMP-MPA	KDT	PCR (VIM)
A1	<i>A.baumannii</i>	Yara-pü	Reanimasyon	N	P	N	N	P
A2	<i>A. bau/calc complex*</i>	Kan	Reanimasyon	N	P	P	N	P
A3	<i>A. baumannii</i>	Kateter	Yanık ünitesi	N	P	P	N	P
A4	<i>A. baumannii</i>	Kan	Reanimasyon	N	P	P	N	P
A5	<i>A. bau/calc complex*</i>	Kan	Onkoloji	P	N	P	N	P
A6	<i>A. baumannii</i>	ETA	GH	N	P	P	N	P
A7	<i>A. bau/calc complex*</i>	Yara-pü	OT	N	P	N	N	P
A8	<i>A. baumannii</i>	ETA	Yanık ünitesi	N	P	N	N	P
A9	<i>Acinetobacter spp.</i>	ETA	Nöroloji-YB	P	N	P	N	P
A10	<i>A. baumannii</i>	ETA	Reanimasyon	P	P	N	N	P
A11	<i>A. baumannii</i>	ETA	GH	P	P	P	N	P
A12	<i>A. baumannii</i>	BOS	Nöroşirurji	N	P	N	N	P
A13	<i>A. baumannii</i>	Balgam	GH-YB	N	P	P	N	P
A14	<i>A. baumannii</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	P	N	N	P
A15	<i>A. bau/calc complex*</i>	ETA	Reanimasyon	P	P	N	N	P
A16	<i>A. baumannii</i>	BOS	Nöroşirurji	N	P	N	N	P
A17	<i>A. baumannii</i>	Yara-pü	GH	P	P	N	N	P
A18	<i>A. bau/calc complex*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	P	P	N	P
A19	<i>A. baumannii</i>	Kan	KHD	N	P	N	N	P
A20	<i>A. baumannii</i>	ETA	GC-YB	N	P	N	N	P
A21	<i>A. baumannii</i>	İdrar(sonda)	Reanimasyon	N	N	P	N	P
A22	<i>A. baumannii</i>	BOS	Yanık ünitesi	N	N	N	N	P
A23	<i>A. baumannii</i>	ETA	Onkoloji	P	P	N	P	P
A24	<i>A. baumannii</i>	Kan	Onkoloji	P	P	N	P	P
A25	<i>A. bau/calc complex*</i>	Kan	Reanimasyon	P	P	P	N	P
A26	<i>A. bau/calc complex*</i>	ETA	Reanimasyon	P	P	N	N	P
A27	<i>A. baumannii</i>	Yara-pü	OT	N	N	P	N	P
A28	<i>A. bau/calc complex*</i>	Apse	Reanimasyon	P	P	N	N	P
A29	<i>A. baumannii</i>	İdrar(sonda)	FTR	P	P	N	N	N
A30	<i>A. baumannii</i>	Kan	Nöroloji-YB	P	P	N	P	P
A31	<i>A. baumannii</i>	Yara-pü	Yanık ünitesi	P	N	P	N	N
A32	<i>A. baumannii</i>	Plevra sıvısı	Onkoloji	P	P	P	N	P
A33	<i>Acinetobacter spp.</i>	Yara-pü	GH-YB	N	P	N	N	P
A34	<i>A. baumannii</i>	Yara-pü	PRC	P	P	N	P	P
A35	<i>A. bau/calc complex*</i>	İdrar(sonda)	GC-YB	N	P	N	P	P

**A. bau/calc complex*: *A. baumannii/calcoaceticus complex*

P: Pozitif

N: Negatif

Tablo-8: Karbapenem dirençli *Pseudomonas* izolatlarının fenotipik ve genotipik test sonuçları.

İzolat no	İzolat	Örnek	Klinik	MHT	Etest	ÇDST CAZ-MPA	ÇDST IMP-EDTA	KDT	PCR (IMP)
P1	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	P	N	P	P	P	P
P2	<i>P.aer*</i>	İdrar (sonda)	Reanimasyon	N	D	N	N	N	N
P3	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	N	N	N	N	N
P4	<i>P.aer*</i>	İdrar (orta akım)	Üroloji	N	N	N	N	N	N
P5	<i>P.aer*</i>	ETA	GC-YB	N	N	N	N	N	N
P6	<i>P.aer*</i>	Yara-pü	Reanimasyon	N	N	N	N	N	N
P7	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	P	P	P	P	P
P8	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	D	N	N	N	N
P9	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	N	P	N	N	N
P10	<i>P.aer*</i>	Safra	GC	N	N	N	N	N	N
P11	<i>P.aer*</i>	Safra	Gastroent.**	N	N	N	N	N	N
P12	<i>P.aer*</i>	Burun sürüntü	ÇSH-YB	N	N	N	N	N	N
P13	<i>P.aer*</i>	Ameliyat materyali	KDC	N	N	N	N	P	N
P14	<i>P.aer*</i>	Kateter	Reanimasyon	N	N	N	N	N	N
P15	<i>P.aer*</i>	Balgam	ÇEH	N	N	N	N	N	N
P16	<i>P.aer*</i>	ETA	GC-YB	N	N	N	N	N	N
P17	<i>P.aer*</i>	Balgam	EH	N	N	N	N	N	N
P18	<i>P.aer*</i>	Ampiyem	EH	N	N	P	N	P	N
P19	<i>P.aer*</i>	Plevra sıvısı	GÖC	N	N	N	N	N	N
P20	<i>P.aer*</i>	Kateter	Reanimasyon	N	N	N	N	N	N
P21	<i>P.aer*</i>	Kateter	Nöroloji-YB	N	N	N	N	N	N
P22	<i>P.aer*</i>	Bronş lavajı	Nöroloji-YB	N	N	N	N	N	N
P23	<i>P.aer*</i>	Balgam	ÇEH-Poliklinik	N	D	N	P	N	N
P24	<i>P. putida</i>	İdrar (sonda)	Yanık ünitesi	N	D	N	N	P	N
P25	<i>P.aer*</i>	ETA	ÇEH	N	N	N	N	N	N
P26	<i>P.aer*</i>	Dren mayi	GC	N	D	N	N	N	N
P27	<i>P. putida</i>	İdrar (orta akım)	OT	N	D	N	N	N	N
P28	<i>P. putida</i>	İdrar (sonda)	Üroloji	N	D	N	N	N	N
P29	<i>P.aer*</i>	Balgam	GH	N	D	N	N	N	N
P30	<i>P.aer*</i>	İdrar (orta akım)	ÇEH-Poliklinik	N	D	N	N	N	N
P31	<i>P.aer*</i>	ETA	Reanimasyon	N	N	N	N	N	N
P32	<i>P.aer*</i>	ETA	Nöroloji-YB	N	P	P	P	P	P
P33	<i>P.aer*</i>	Yara-pü	EH-Poliklinik	N	D	N	N	N	N
P34	<i>P.aer*</i>	İdrar (sonda)	Üroloji	N	N	N	N	N	N
P35	<i>P.aer*</i>	Kateter	GC-YB	N	N	N	N	N	N

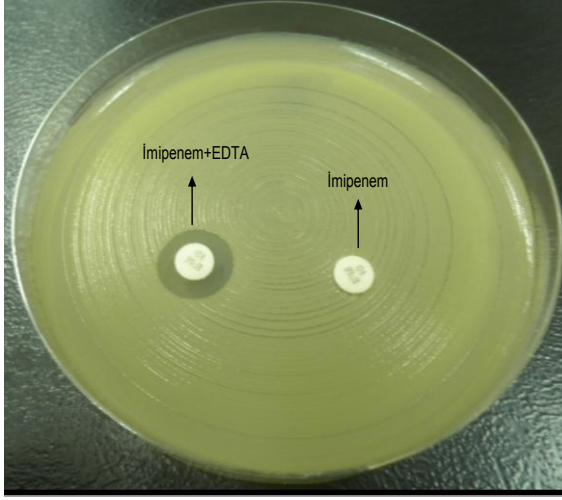
* *P. aer*: *P. aeruginosa*

**Gastroent: Gastroenteroloji

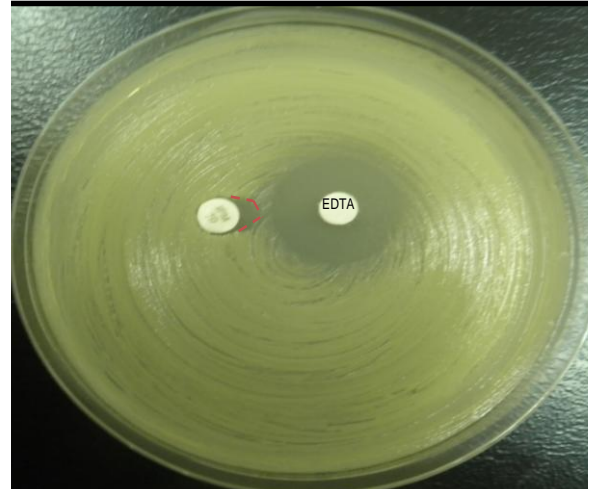
D: Değerlendirilemedi

P: Pozitif N: Negatif

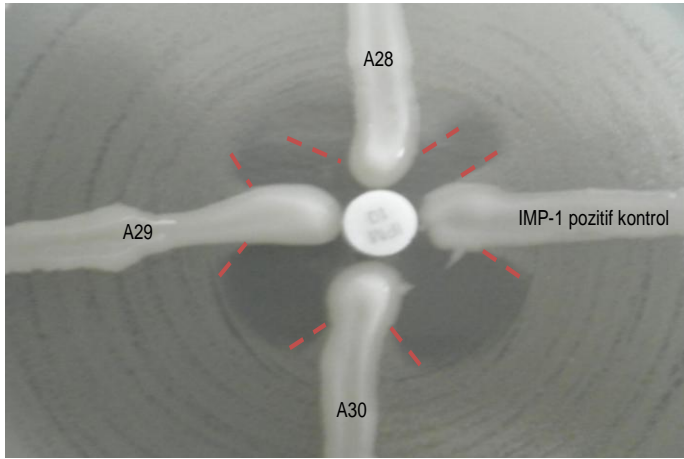
Fenotipik testler ile MBL pozitifliği saptanan suřlara ait görüntüler Şekil-10, 11,12 ve 13'te gösterilmiştir.



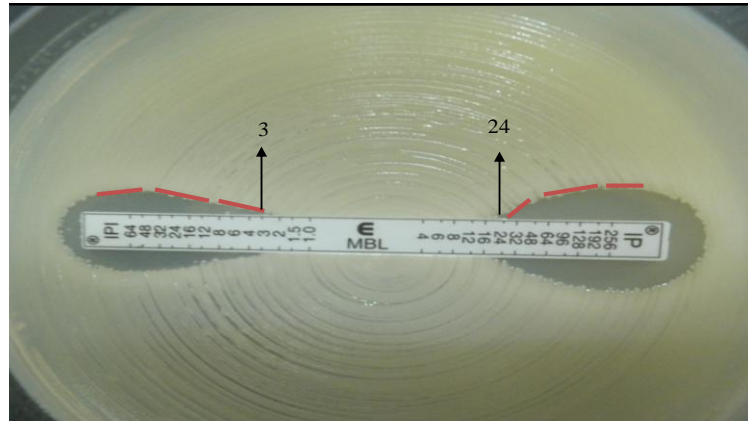
Şekil-10: MBL pozitif kombine disk testi.



Şekil-11: MBL pozitif imipenem-EDTA ift disk sinerji testi.



Şekil-12: MBL pozitif modifiye Hodge testi.



Şekil-13: MBL pozitif Etest.

Acinetobacter ve *Pseudomonas* suşlarına ait fenotipik test sonuçları arasındaki uyum oranları hesaplandı. Bunun için Tablo-7 ve Tablo-8'deki veriler kullanılarak her iki test ile pozitif ve her iki test ile negatif bulunan izolat sayısı toplamı toplam çalışılan izolat sayısına bölündü.

Buna göre Etest ile en uyumlu fenotipik test *Acinetobacter* suşları için MHT (%45), *Pseudomonas* izolatları için IMP-EDTA ÇDST (%96) bulundu (Tablo-9,10).

Tablo-9: *Acinetobacter* suşlarında fenotipik testlerin uyum oranları.

Testler	Uyum oranı (%)
KDT- MHT	62
ÇDST – MHT	48
ÇDST – KDT	45
MHT – Etest	45
KDT – Etest	31
ÇDST – Etest	28

ÇDST: Çift disk sinerji testi KDT: Kombine disk testi MHT: Modifiye Hodge testi

Tablo-10: *Pseudomonas* suşlarında fenotipik testlerin uyum oranları.

Testler	Uyum oranı (%)
IMP-EDTA ÇDST – Etest	96
IMP-EDTA ÇDST - MPA-CAZ ÇDST	91
IMP-EDTA ÇDST - MHT	91
MPA-CAZ ÇDST - KDT	91
IMP-EDTA ÇDST - KDT	88
MPA-CAZ ÇDST – MHT	88
KDT – Etest	88
MHT – Etest	88
MPA-CAZ ÇDST – Etest	88
KDT - MHT	85

ÇDST: Çift disk sinerji testi KDT: Kombine disk testi MHT: Modifiye Hodge testi

Çalışmada karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli yer tutan ve mobil DNA elemanları aracılığı ile gram negatif patojenler arasında hızla yayılma eğilimi gösteren kazanılmış MBL enzimleri PCR ile araştırıldı. Bu amaçla 4 tip MBL enzimi (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM* ve *blaSPM*) için özgül primerler kullanıldı.

Acinetobacter ve *Pseudomonas* suşlarının hiçbirinde *blaSPM* (271 bp) ve *blaNDM* (621 bp) genlerine spesifik bant oluşumu gözlenmedi.

Sadece 3 *P. aeruginosa* suşunda (%8,5) *blaIMP* genine spesifik 232 bp'lik bant oluştuğu gözlemlendi (Şekil-14, Tablo-8). Hiçbir *Acinetobacter* izolatında IMP tipi MBL geni saptanmadı.

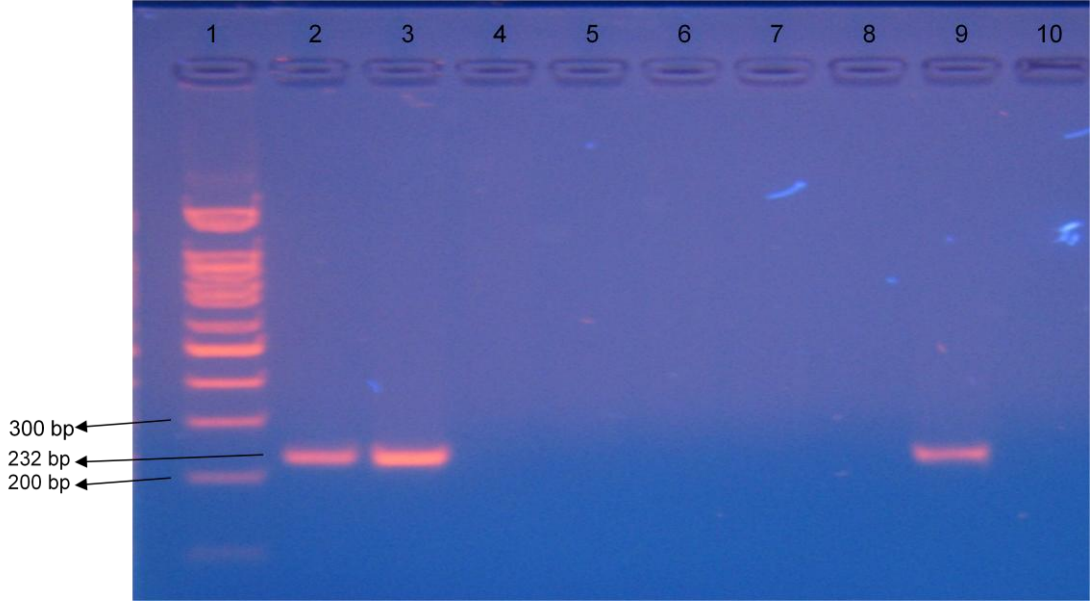
Acinetobacter izolatlarının 33'ünde (%94,2) *blaVIM* genine spesifik 390 bp'lik bant oluştuğu gözlemlendi (Şekil-15, Tablo-7). Hiçbir *Pseudomonas* suşunda VIM tipi MBL geni saptanmadı. VIM tipi MBL geninin saptanmadığı 2 *A. baumannii* suşundan biri (A29) Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği'nden gönderilen sonda idrarından, diğeri (A31) ise Yanık Ünitesi'nden gönderilen yara-pü örneğinden izole edilmişti. Her iki izolatta KDT sonuçları negatif, MHT sonuçları ise pozitif bulundu. Buna karşılık ÇDST sonuçları (A29 için negatif, A31 için pozitif) ile Etest sonuçları (A29 için pozitif, A31 için negatif) değişkenlik gösterdi (Tablo-7). VIM tipi MBL geni bulunmayan *A. baumannii* suşlarından A29 sadece trimetoprim-sulfametoksazole; A31 ise sefepim ve gentamisine duyarlı bulundu (Tablo-5).

Acinetobacter izolatları için 4 gen bölgesinin araştırıldığı PCR sonuçları ile fenotipik testlerin sonuçları karşılaştırıldığında; KDT'nin duyarlılığı %15, özgüllüğü %100; MHT'nin duyarlılığı %42, özgüllüğü %0; ÇDST'nin duyarlılığı %39, özgüllüğü %50; Etest'in duyarlılığı %84,8, özgüllüğü %50 hesaplandı.

IMP tipi MBL geninin saptandığı *P. aeruginosa* suşlarının tümü (P1, P7 ve P32) Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi'nden gönderilen ETA örneklerinden izole edilmişti. Hepsinde KDT, CAZ-MPA ÇDST ve IMP-EDTA ÇDST pozitif sonuçlandı. MHT ile sadece P1 suşunda pozitiflik saptandı, bu suşun Etest sonucu negatif olup; diğeri izolatların (P7 ve P32) Etest sonuçları pozitif bulundu (Tablo-8). IMP tipi MBL genine sahip izolatların tümü imipenem,

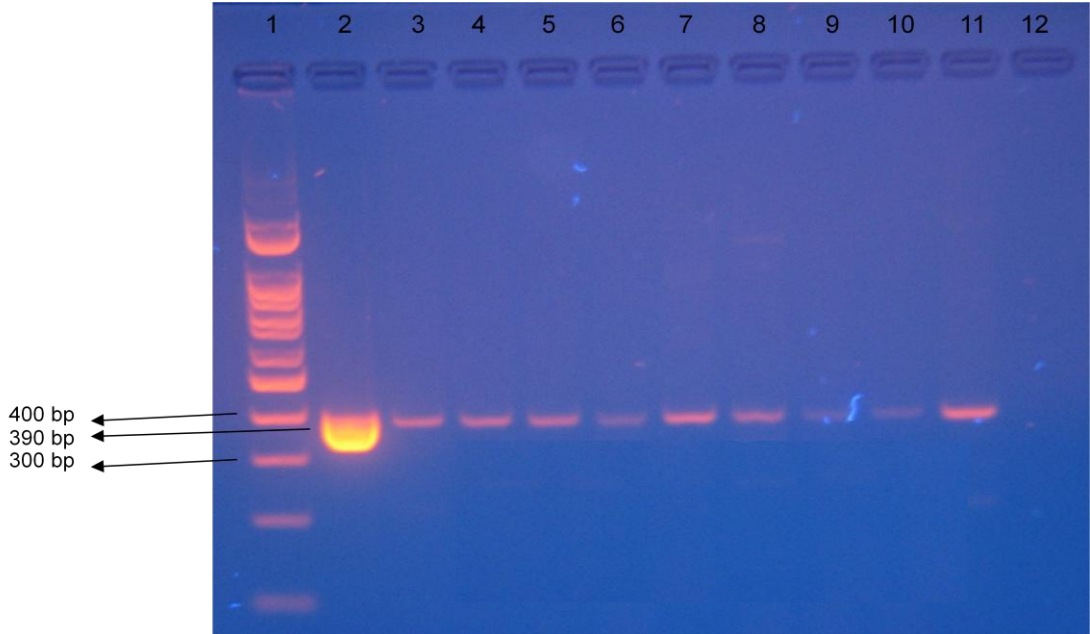
meropenem ve seftazidime dirençli; kolistin, siprofloksasin ve levofloksasine duyarlı olup; aztreonam için direnç paterni değişkenlik (P1 ve P32 duyarlı, P7 dirençli) gösterdi (Tablo-6).

Pseudomonas izolatları için 4 gen bölgesinin araştırıldığı PCR sonuçları ile fenotipik testlerin sonuçları karşılaştırıldığında; KDT'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %90; MHT'nin duyarlılığı %33, özgüllüğü %100; CAZ-MPA ÇDST'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %93; IMP-EDTA ÇDST'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %96; Etest'in duyarlılığı %66, özgüllüğü %100 hesaplandı.



Şekil-14: *blaIMP* genine spesifik PCR jel görüntüsü.

1. sıra: 100 bp ladder, 2. sıra: IMP-1 pozitif *K. pneumoniae*, 3. sıra: P1, 4. sıra: P2, 5. sıra: P3, 6. sıra: P4, 7. sıra: P5, 8. sıra: P6, 9. sıra: P7, 10. sıra: negatif kontrol.



Şekil-15: *blaVIM* genine spesifik PCR jel görüntüsü.

1. sıra: 100 bp ladder, 2. sıra: VIM-1 pozitif *P. aeruginosa*, 3. sıra: A15, 4. sıra: A16, 5. sıra: A17, 6. sıra: A18, 7. sıra: A19, 8. sıra: A20, 9. sıra: A21, 10. sıra: A22, 11. sıra: A23, 12. sıra: negatif kontrol.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Nonfermentatif gram negatif bakteriler doğada yaygın olarak bulunan, sağlıklı kişilerde nadiren enfeksiyona yol açan, genellikle hastane enfeksiyonu ile ilişkili patojenlerdir. Hastane ortamında ventilatörler ile aksesuarlarından, hasta yatakları ve diğer gereçlerin yanı sıra hastane çalışanlarının cildinden de izole edilebilirler. *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri klinik önemi olan nonfermentatif gram negatif bakteriler arasında ön sıralarda yer almaktadır. Giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde zorluklar bulunmaktadır (92).

Dünyanın değişik bölgelerinden farklı direnç oranları bildirilmektedir. SENTRY antimikrobiyal sürveyans çalışmasına göre 1997-99 yılları arasında çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* oranları Latin Amerika'da %8,2, Avrupa'da %4,7, Asya-Pasifik'te %1,6, Amerika Birleşik Devletleri'nde %1,2 ve Kanada'da %0,9 saptanmıştır (93). MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) çalışmasının 2007 verilerinde nozokomiyal enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde direnç oranları sırasıyla meropenem için %14,8 ve %12, imipenem için %30,2 ve %12,6, seftazidim için %26,1 ve %47, piperasilin-tazobaktam için %19,6 ve %38,5, siprofloksasin için %23,2 ve %51,2, gentamisin için %37,7 ve %41,5 tobramisin için %25,8 ve %26,7 bildirilmiştir (94). *Acinetobacter* türleri ile *P. aeruginosa*'da 2003-2008 yılları arasında yapılan CMSS (Chinese Meropenem Surveillance Study) çalışmasının sonuçlarına göre; meropenem ve imipenem duyarlılıklarının *Acinetobacter* türleri için sırasıyla %94,6'dan %60,7'ye ve %92,5'ten %62,1'e; *P. aeruginosa* için ise %86,2'den %76'ya ve %74,8'den %70,5'e gerilediği gösterilmiş; çok ilaca dirençli *A. baumannii* oranı %59,4; *P. aeruginosa* oranı %17,1 bulunmuştur (95). Amerika Birleşik Devletleri'nde NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) çalışmasının 1992-2004 yıllarına ait verilerine göre çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarının %21-32 arasında değiştiği (96); EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) çalışmasının

2005-2011 yıllarına ait verilerine göre ise *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin %18,6; çoklu ilaç direncinin %15,3 olduğu bildirilmiştir (97). Queenan ve ark. (98) 2010 yılında 514 *Acinetobacter* izolatında duyarlılıkları levofloksasin için %41, piperasilin-tazobaktam için %39, seftazidim için %45, karbapenem için %47-51, tobramisin için %58 bulmuşlar; izolatların %54'ünde çoklu ilaç direnci saptamışlardır.

Değişik merkezlere göre direnç oranlarının oldukça farklılık gösterdiği ülkemizde, 13 merkezin katıldığı ve 2007 yılı izolatlarının değerlendirildiği HİTİT-2 sürveyans çalışması verilerine göre *A. baumannii*'de en düşük direnç oranı sefoperazon-sulbaktam (%52) ve imipenem (%55,5) için saptanmış (99); 2007 MYSTIC sürveyans çalışması Türkiye sonuçlarına göre ise *Acinetobacter* suşlarında en etkili antibiyotiklerin karbapenemler olduğu, bu suşların %49'unun çok ilaca dirençli ve bunların da 1/3'ünün denenen tüm antibiyotiklere dirençli (panrezistan) bulunduğu bildirilmiştir (100).

Çalışmamızda *Acinetobacter* izolatlarının %62,8'i amikasine, %88,5'i sefepime, %97,1'i siprofloksasine, %80'i gentamisine, %91,4'ü trimetoprim-sulfametoksazole, %100'ü imipenem, meropenem, seftazidim ve piperasilin-tazobaktama dirençli bulunmuştur. Ayrıca *Pseudomonas* izolatlarının %28,5'i (n:10), *Acinetobacter* izolatlarının %88,5'i (n:31) çoklu ilaç direnci göstermiştir.

Nonfermentatif gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci enzim üretimi, eflüks pompalarının aşırı ekspresyonu, hedef bölge değişiklikleri, dış membran proteinleri veya porinlerin kaybı gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelir. Genellikle aynı mikroorganizmada birden çok direnç mekanizması birlikte bulunur (92). Karbapenemlere karşı direnç sıklıkla pompa sistemleri ve membran geçirgenliğindeki azalmaya bağlı olarak gelişmekle birlikte; MBL'larla ilişkili direnç, karbapenemlerin yanı sıra birçok beta-laktam antibiyotiğe karşı direnç gelişimine de sebep olmaları, klinikte kullanılabilecek inhibitörlerin bulunmayışı ve mobil genetik elemanların (integronlar) üzerinde taşınarak bakteriler arasında hızla yayılabilmeleri nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca MBL genlerini taşıyan integronlar farklı antibiyotik sınıfları (örn: aminoglikozidler, kloramfenikol),

dezenfektanlar veya diğer beta-laktamaz genlerinin direnç faktörlerini taşıyan ek gen kasetlerini de barındırabilmektedir. Bu nedenle MBL üreten bakteriler, etken oldukları düşünülme bile dikkate alınmalıdır çünkü aynı hastanın diğer vücut bölgelerine veya yakınındaki diğer hastalara bulaşma riski taşırlar. Bir çalışmada MBL pozitif *P. aeruginosa*'nın klinik örnekten ilk izolasyonundan 6-12 ay sonra hastane çevrelerinden izole edilebildiği gösterilmiştir (101). Dolayısıyla MBL üreten suşların erken tanımlanması uygun tedavi protokollerini belirlemek ve çoklu direncin yayılmasını önlemek için gereklidir.

Gram negatif bakterilerde MBL varlığını araştıran çalışmalarda izolatların seçimiyle ilgili farklı kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Bazı araştırmacılar seftazidime (102), bazıları seftazidim ve/veya imipeneme (90), bazıları da (103, 104, 105) bizim gibi karbapenemlere dirençli mikroorganizmaları çalışma kapsamına almışlardır. Cornaglia ve ark. (106) imipenem direncinin kriter olarak alındığı çalışmalarda MBL ürettiği halde karbapenemlere düşük düzeyde direnç gösteren suşların gözden kaçabileceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle suş seçiminin iyi planlanması gerekmektedir.

Suşların belirlenmesini takiben MBL araştırılmasında kullanılacak yöntem seçimi gündeme gelmektedir. Bütün MBL'lar aktif bölgelerindeki çinkonun uzaklaştırılmasından etkilendikleri için çalışmalar bu özellik göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bununla birlikte MBL'lar arasındaki fark aktif bölgelerindeki küçük varyasyonlardan kaynaklanmakta bu nedenle tek bir inhibitör ajan tüm enzimlere etkin olamamaktadır. Dolayısıyla fenotipik testlerin sonuçları kullanılan yöntem, bakterinin cinsine, beta-laktam substrata ve MBL inhibitörüne bağlı olarak uyumsuzluk gösterebilmektedir (5). Günümüzde standardize edilmiş herhangi bir fenotipik yöntemin bulunmaması nedeniyle çalışmalar duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek testin belirlenmesine odaklanmıştır.

Bu çalışma değişik fenotipik testlerin (KDT, Etest, ÇDST, MHT) duyarlılık ve özgüllüklerini 4 gen bölgesini (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM* ve

blaSPM) hedef alan ve fenotipik yöntemlerden daha duyarlı olan PCR sonuçlarına göre belirlemek amacıyla yapıldı.

Farklı MBL enzimlerine sahip bakteri türlerinde değişik beta-laktam ve MBL inhibitörleri kullanılarak, çelişkili sonuçların elde edildiği çok sayıda ÇDST çalışması yapılmıştır. Arakawa ve ark. (102) IMP-1 pozitif gram negatif bakterilerin tanımlanmasında inhibitör olarak 2-3 µL 2-MPA, substrat olarak seftazidim ile daha iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmişler; imipenem kullanıldığında imipeneme azalmış duyarlılık (MİK 4-8 µg/ml) gösteren suşlarda tiyol bileşiklerinin inhibitör etkisinin belirsiz olabileceğini vurgulamışlardır. Bununla birlikte ülkemizde yapılan bir çalışmada imipenem dirençli 79 *Acinetobacter* izolatının %55,7'sinde CAZ-3 µL 2-MPA ÇDST ile MBL pozitifliği saptanmış ancak PCR ile bu suşların hiçbirinde *blaIMP-1* gösterilememiştir (104). Lee ve ark. (107) IMP-1.900 µg EDTA ÇDST ile *blaVIM-2* pozitif bütün *Pseudomonas* izolatlarını, IMP-3 mg sodyum merkaptasetik asit ÇDST ile de *blaIMP-1/ blaVIM-2* pozitif bütün *Acinetobacter* izolatlarını saptadıklarını bildirmişlerdir. Farklı şelatör ajanlar ile beta-laktamların kullanıldığı başka bir çalışmada da IMP-20 µL 1:320 MPA'lı Tris-EDTA diski ile bütün MBL üreten izolatların saptandığı, yalancı pozitifliğin bulunmadığı rapor edilmiştir (108).

Qu ve ark. (105) PCR ile *blaIMP-1*, *blaIMP-9*, *blaVIM-2* pozitif saptanan *P. aeruginosa* izolatlarında EDTA (10 µL, 0.1 M) - CAZ ÇDST ve 2-MPA (3 µL) - CAZ ÇDST'nin duyarlılıklarını sırasıyla %90,5 ve %95,2; özgüllüklerini ise %97,5 ve %91,4 bulmuşlardır. Picao ve ark. (90), genetik olarak birbirleriyle ilişkisi olmayan, farklı MBL üreten *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Acinetobacter* türleri ve enterik bakteriler ile yaptıkları geniş kapsamlı çalışmada *Pseudomonas* türlerinde CAZ- 5 µL 2-MPA ÇDST, *Acinetobacter* türlerinde ise IMP-5 µL 2-MPA ÇDST için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin %100'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ÇDST ile MBL pozitifliği saptanan (n:14, %40) *Acinetobacter* izolatlarının 13'ü (%92,8) PCR ile *blaVIM* pozitif bulundu. Ancak PCR ile *blaVIM* pozitifliği saptanan 20 izolatta ÇDST ile MBL varlığı gösterilemedi. *Acinetobacter* türleri için ÇDST'nin duyarlılığı %39, özgüllüğü

%50 olup; sadece 1 izolatta yalancı pozitiflik saptandı. Testte metal şelatör olarak kullanılan ajanların (EDTA, 2-MPA vb.) oluşturduğu özgül olmayan geniş inhibisyon zonunun yalancı pozitiflik nedeni olabileceği düşünüldü. Nitekim Picao ve ark.'nın (90) kullandığı metal şelatör miktarının (5 µL 2-MPA) çalışmamızda *Pseudomonas* izolatlarının üremesini büyük ölçüde inhibe ettiği ve testin değerlendirilmesini zorlaştırdığı saptandı. Bu nedenle Qu ve ark.'nın (105) kullandığı miktar (3 µL 2-MPA) ile test tekrarlanarak bu olumsuzluk giderildi. Ayrıca tüm *Pseudomonas* izolatları seftazidime dirençli olmadığı için farklı bir beta-laktam ve inhibitör (IMP-10 µL, 0.5 M EDTA) ile de ÇDST yapıldı (109). Buna göre CAZ-MPA ÇDST ile 5 (%14,2), IMP-EDTA ÇDST ile 4 (%11,4) *Pseudomonas* suşunda MBL pozitifliği saptandı. *Pseudomonas* izolatları için CAZ-MPA ÇDST'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %93; IMP-EDTA ÇDST'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %96 hesaplandı. *Pseudomonas* izolatlarında tüm fenotipik testler içinde en iyi sonuçlar IMP-EDTA ÇDST ile elde edildi. IMP-EDTA ÇDST'nde 1 (P23); CAZ-MPA ÇDST'nde ise 2 (P9, P18) suşta yalancı pozitiflik saptandı (Tablo-8). Aktaş ve ark. (103) PCR ile *blaVIM* ve *blaIMP* negatif bulunan *P. aeruginosa* izolatlarının %63,6'sında, *A. baumannii* izolatlarının ise %78,5'inde IMP-0.5 M 10 µL EDTA ÇDST ile MBL pozitifliği saptadıklarını ancak izolatların hiçbirinde IMP-0.1 M 10 µL EDTA ÇDST ile MBL pozitifliği gözlemediklerini bildirmişler; sinerji testlerinde 0.1 M EDTA bileşiğinin kullanılmasını önermişlerdir. Çalışmamızda *Pseudomonas* izolatlarında IMP- 0.5 M 10 µL EDTA ÇDST'nin özgüllüğünü metal şelatör konsantrasyonu etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda *Acinetobacter* izolatları için ÇDST'nin duyarlılığı Picao ve ark.'nın (90) aksine düşük (%39) bulundu. Aslında ÇDST'nde beta-laktam ajana ait inhibisyon zonunun MBL inhibitörüne doğru genişlemesi subjektif değerlendirmeye neden olabilir. Test edilecek izolatın kullanılan beta-laktam ajana direnci bu noktada önem kazanmaktadır. Dirençli izolatlarda sinerji zonu kolaylıkla gözlenirken, orta dirençli veya duyarlı izolatlarda bu zon belirgin olarak seçilememekte; yalancı negatif sonuçlara neden olmaktadır. Çalışmamızda *Acinetobacter* izolatlarının tümü imipeneme dirençli olduğundan yalancı negatifliklerin olası nedeni subjektif değerlendirmeden

kaynaklanmamaktadır. Ikonomidis ve ark. (110) IMP-10 µl 0.1 M EDTA ÇDST ile MBL negatif 87 *A. baumannii* izolatının 2'sinde PCR ile VIM-1 geni saptamışlar; genin zayıf ekspresyonunun fenotipe yansımayaabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca integronda taşınan gen kasetlerinin ekspresyonu ve düzeyi, bakterideki integron sayısı ve integronun 5' ucundaki promotor bölgesinin aktivitesi ile ilişkilidir (111). *Acinetobacter* izolatlarında ÇDST için saptadığımız düşük duyarlılığın nedeni genin zayıf ekspresyonundan kaynaklanabilir. Ekspresyon analizleri bu konuda faydalı olabilir.

MBL enzimlerinin araştırılmasında değerlendirilmesi ÇDST'ne göre daha objektif olan KDT, sıklıkla kullanılan fenotipik bir yöntemdir. ÇDST'nde gerçek sinerjizmin inhibisyon zonlarının kesişmesinden ayırt edilmesi yorumlayan kişinin deneyimine bağlıdır. KDT ile yapılan çalışmalarda da kullanılan çeşitli inhibitörlerin, eşik değer olarak kabul edilen zon çapı farklarının sonuçları etkilediği gösterilmiştir. Qu ve ark. (105) ÇDST, KDT, Etest ve PCR ile *P. aeruginosa* izolatlarında MBL varlığını araştırmışlar; en iyi sonuçları IMP- 750 µg EDTA'nın kullanıldığı ve 6 mm'lik zon çapı farkının eşik değer kabul edildiği KDT ile elde etmişler; testin duyarlılığını, özgüllüğünü, pozitif ve negatif prediktif değerlerini %100 olarak belirlemişlerdir. Sadece *P. aeruginosa* izolatlarında yapılmış olmakla birlikte KDT'nin ÇDST ve hatta Etestten daha üstün olduğunu vurgulamışlardır. Picao ve ark. (90) farklı MBL genlerine sahip izolatlarda 8 mm'lik zon çapı farkını eşik değer kabul ettikleri ve inhibitör bileşik olarak CAZ-EDTA / CAZ-MPA kullandıkları KDT ile *Pseudomonas* türleri için testin duyarlılığını %96, özgüllüğünü %100 bulmuşlar; *Acinetobacter* türleri için testin performansının iyi olmadığını vurgulamışlardır.

Ülkemizdeki çalışmalarda KDT için yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olduğu gözlenmektedir. Aktaş ve ark. (103) *blaIMP* ve *blaVIM* negatif *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında IMP-0.5 M 10 µL EDTA'nın kullanıldığı KDT ile yalancı pozitifliği %100 bulmuşlar, IMP- 0.1 M 10 µL EDTA ile yalancı pozitiflik oranının gerilediğini (%0-10,7) saptamışlardır. Dağı ve ark. (112) IMP-0.5 M 10 µL EDTA'nın kullanıldığı KDT ile karbapenem dirençli 202 *A. baumannii* suşunun 139'unda (%69) MBL pozitifliği bulmuşlar

ancak izolatların hiçbirinde PCR ile *blaIMP* ve *blaVIM* genlerini gösterememişlerdir. Yalancı pozitifliğin EDTA'nın bakterisidal etkisinden kaynaklanabileceğini veya karbapenem direncinden IMP ve VIM dışı enzimlerin sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. PCR ile sadece *blaIMP-1* geninin araştırıldığı bir çalışmada da IMP-0.5 M 10 µL EDTA'nın kullanıldığı KDT ile 79 *Acinetobacter* izolatının % 58,2'sinde MBL varlığı saptanmış ancak izolatların hiçbirinde PCR pozitifliği gösterilememiştir (104). Genotipik yöntemlerle sonuçların irdelenmediği başka bir çalışmada ise IMP-0.5 M 10 µL EDTA'nın kullanıldığı KDT ile imipenem dirençli 70 *A. baumannii* izolatının %79'unda MBL pozitifliği saptanmıştır (113).

Çalışmamızda *Pseudomonas* türleri için CAZ-0.5 M 10 µL EDTA, *Acinetobacter* türleri için ise IMP-0.5 M 10 µL EDTA'nın kullanıldığı; 7 mm'lik zon çapı farkının eşik değer kabul edildiği KDT ile *Pseudomonas* izolatlarının 6'sında (%17,1), *Acinetobacter* izolatlarının 5'inde (%14,2) MBL pozitifliği elde edildi. MBL enzimlerine ait 4 gen bölgesinin araştırıldığı PCR sonuçlarına göre KDT için *Pseudomonas* izolatlarında duyarlılık %100, özgüllük %90; *Acinetobacter* izolatlarında duyarlılık %15, özgüllük %100 bulundu. Picao ve ark.'nın (90) çalışmasındaki gibi KDT *Pseudomonas* türlerinde daha iyi performans gösterdi. Ülkemizdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında KDT ile saptadığımız yalancı pozitiflik (P13, P18, P24) oldukça düşük (%8,5) bulundu. EDTA'nın bakteri hücre duvarı geçirgenliğini artırarak bakterisidal özellik kazanması, EDTA ile şelasyon oluşturan çinkonun imipenemin etkinliğini ve *P. aeruginosa*'nın OprD ekspresyonunu azaltması yalancı pozitifliğin nedeni olarak gösterilmektedir (114). *Acinetobacter* türlerinde KDT için saptadığımız duyarlılık sonuçları eşik değer olarak zon çapı farkı 6 mm alındığında %45,4, 5mm alındığında ise %81 olarak değişmekte; ancak her iki durumda da testin özgüllüğü %50'ye gerilemektedir.

MBL üreten bakterilerin varlığında imipenemin hidrolize olması ve böylece imipenem duyarlı standart *E. coli* suşunun üreyebilmesi temeline dayanan, çalışma prensibi şelatör ajanlarla MBL inhibisyonu yapılan diğer testlerden farklı olan MHT; uygulaması kolay bir fenotipik tanı aracıdır. Ancak

OXA-23, OXA-48, KPC vb. enzimler (MBL dışı) de imipenem hidrolizine neden olduğundan bu test CLSI tarafından *Enterobacteriaceae*'de karbapenemaz varlığını saptamak için önerilmektedir (89). Testin nonfermentatif gram negatif bakterilerdeki ve MBL tayininindeki performansı ile ilgili farklı veriler mevcuttur. Doyle ve ark. (115) karbapenemaz üreten 142 *Enterobacteriaceae* izolatında MHT'nin performansını KPC ve OXA-48 vb. enzimler için iyi IMP, VIM ve NDM için zayıf bulmuşlar; MHT ve Etestin değerlendirilmesinin genellikle zor olduğunu vurgulamışlardır. İmipeneme dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarında yapılan bir çalışmada ise imipenem hidroliz testine göre MHT'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %88 bulunmuştur (116). Oh ve ark. (117) da imipenem ve/veya seftazidime dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında PCR ile MBL pozitifliği saptadıkları 35 suşun (33'ü VIM-2, 2'si IMP-1) 30'unu MHT ile pozitif değerlendirmişlerdir.

MHT'nin performansını arttırmak amacıyla çeşitli değişiklikler denenmiştir. Lee ve ark. (107) genotipik yöntemlerle MBL pozitifliği saptanan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarının (n:39) MHT ile 26'sını pozitif, 10'unu şüpheli, 3'ünü negatif değerlendirmişler; testi IMP diskine 10 µL 50 mM çinko sülfat ekleyerek tekrarladıklarında şüpheli ve yalancı negatif sonuçların pozitifleştiğini gözlemişlerdir. Pasteran ve ark. (118) MHT ile *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz varlığını araştırmışlar; indikatör olarak *E. coli* ATCC 25922 yerine *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanıldığında testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %98 bulmuşlardır.

Ülkemizde MHT'nin moleküler yöntemlerle desteklediği yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Çakar ve ark. (109) PCR ile *blaVIM* geni pozitif 11 *P. aeruginosa* izolatının sadece 2'sinde MHT ile; 4'ünde çinko sülfat ile zenginleştirilmiş MHT ile pozitiflik bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada MHT'nin bazı kontrol suşlarını (VIM-1, IMP-1 ve IMP-2 pozitif) saptayamadığı gözlenmiştir. Al ve ark. (104) ise MHT ile % 69,6 MBL pozitifliği saptadıkları *Acinetobacter* izolatlarında *blaIMP-1* geninin bulunmadığını; diğer MBL genlerinin de araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır. Sadece fenotipik

yöntemlerin kullanıldığı diğer çalışmalarda da MHT ile MBL pozitifliğinin %0-97 arasında değiştiği bildirilmektedir (113, 119-121).

Çalışmamızda PCR ile *blaVIM* pozitif 33 *Acinetobacter* suşunun 14'ünde (%42,4); *blaIMP* pozitif 3 *Pseudomonas* izolatının 1'inde (P1) MHT ile MBL pozitifliği saptandı. MHT ile MBL pozitifliği saptanan 16 *Acinetobacter* suşunun 2'sinde (A29 ve A31) ise *blaVIM* negatif bulundu. MHT ile saptanan yalancı pozitifliğin MBL dışı enzimlerden (OXA-23, OXA-48, KPC vb.) kaynaklanabileceği düşünüldü. MBL enzimlerine ait 4 gen bölgesinin araştırıldığı PCR sonuçlarına göre MHT için *Acinetobacter* izolatlarında duyarlılık %42, özgüllük %0; *Pseudomonas* izolatlarında duyarlılık %33, özgüllük %100 bulundu. Bu sonuçlar subjektif kriterlere göre değerlendirilen MHT'nin güvenle kullanılabilir bir yöntem olmadığını göstermektedir. Testin performansının iyileştirilmesi için çeşitli modifikasyonların denendiği çalışmalara gereksinim bulunmaktadır (107, 118).

Etest MBL'ların tayininde sıklıkla kullanılan fenotipik bir yöntemdir. Ticari olarak temin edilen Etest şeridinin bir ucunda imipenem, diğer ucunda imipenem ile birlikte EDTA bulunmakta; imipenem MİK değerinin imipenem+EDTA MİK değerine oranının 8 ve üzerinde bulunması MBL varlığını göstermektedir. ÇDST'e göre değerlendirilmesi daha objektif kabul edilmekle birlikte Etestin MBL tayinindeki performansı tartışmalıdır.

Walsh ve ark. (122) PCR ile MBL pozitifliği saptanan değişik bakterilerde Etestin duyarlılığını %94, özgüllüğünü %95 bulmuşlardır. MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan başka bir çalışmada ise Etest için duyarlılığın %85,7, özgüllüğün %100 olduğu; Etest ile negatif bulunan 6 MBL pozitif izolatın 3'ünde gen ekspresyonunun olmadığı belirtilmiştir (105). Aktaş ve Kayacan (103), Etest ile MBL pozitifliği saptadıkları *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarının hiçbirinde PCR ile MBL genlerini (*blaIMP* ve *blaVIM*) ve hidroliz testi ile imipenemaz aktivitesini gösterememişlerdir. Segal ve Elisha (123) da Etest ile MBL pozitifliği saptanan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının hiçbirinde *blaIMP* ve *blaVIM* bulunmadığını, buna karşılık tümünün *blaOXA-23* pozitif olduğunu bildirmişler; bu nedenle olası oksasilinaz üreten mikroorganizmalarda (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* vb.)

Etestin dikkatli yorumlanması gerektiğini önermişlerdir. EDTA'nın özgül olmayan inhibisyon etkisi ve uygulama hataları Etestte saptanan yalancı pozitifliklerin nedeni olabilir. Etest ile yalancı negatif sonuçlar da gözlenebilmektedir. Nitekim Ikonmidis ve ark. (110) Etest, ÇDST ve KDT ile MBL negatif buldukları *A. baumannii* izolatlarının 2'sinde *blaVIM-1* pozitifliği saptamışlardır. Özgümüş ve ark. (124) da *blaIMP* pozitif 9 *Pseudomonas* izolatının sadece 4'ünde Etest ile MBL pozitifliği bildirmişlerdir.

Ülkemizde nonfermentatif gram negatif bakterilerde yapılan ancak genotipik yöntemlerin kullanılmadığı çalışmalarda Etest ile MBL pozitifliğinin %21-80 arasında değiştiği gösterilmiştir (121, 125, 126).

Çalışmamızda *Acinetobacter* izolatlarının %82,8'inde, değerlendirmeye alınan 25 *Pseudomonas* izolatının 2'sinde (%8) Etest ile MBL pozitifliği saptandı. İmipenem MİK değerleri <4 µg/mL bulunduğu için Etest ile değerlendirilemeyen 10 *Pseudomonas* izolatının 5'inde (P2, P8, P23, P26 ve P33) Phoenix otomatize sisteminde imipenem için >8 µg/mL MİK değerleri saptanmıştı (Tablo-6). Antibiyogram sonuçları arasındaki uyumsuzluk otomatize sistemlerden kaynaklanabilir, bu nedenle sonuçların broth mikrodilüsyon gibi referans bir metotla doğrulanması önerilmektedir (127). Ayrıca Etestin imipeneme duyarlı ve orta derecede duyarlı bakterilerde MBL varlığını saptamada yetersiz kalabileceği unutulmamalıdır.

Nonfermentatif gram negatif bakterilerin MBL enzimlerini araştırdığımız bu çalışmada Etest ile diğer fenotipik testlerin uyumu değerlendirildiğinde; *Pseudomonas* türleri için Etest ile IMP-EDTA ÇDST sonuçları arasında %96, *Acinetobacter* türleri için ise Etest ile MHT sonuçları arasında %45 korelasyon bulundu (Tablo-9, 10).

PCR ile *blaIMP* pozitifliği saptanan 3 *Pseudomonas* izolatının 2'si (P7, P32) Etest ile pozitif, 1'i (P1) negatif bulundu. Diğer fenotipik testlerde de MBL pozitifliği saptanan P1 izolatı için Etest sonucu yalancı negatiflik olarak yorumlandı (Tablo-8). PCR ile *blaVIM* pozitifliği saptanan 33 *Acinetobacter* izolatının ise 28'i Etest ile pozitif, 5'i (A5, A9, A21, A22, A27) negatif bulundu. Diğer fenotipik testleri farklı sonuçlanan 5 *Acinetobacter* izolatı için Etest sonuçları yalancı negatiflik olarak yorumlandı (Tablo-7). PCR sonuçlarına

göre Etestin duyarlılığı ve özgüllüğü *Acinetobacter* izolatları için sırasıyla %84,8 ve %50; *Pseudomonas* izolatları için ise %66 ve %100 bulundu. Bulgularımız Etestte yalancı pozitifliğin yanı sıra yalancı negatifliklerin de oluşabileceğini bu nedenle MBL varlığının moleküler testlerle doğrulanması gerektiğini gösterdi.

MBL saptanmasında en güvenilir testlerin PCR, sekans ve plazmid analizleri olduğu bildirilmiştir. Japonya, Kore, Çin, Brezilya, Yunanistan gibi ülkelerde en fazla görülen MBL tipleri belirlenerek o enzim tipine özgül primerler ile çalışılmaktadır.

Ülkemizde nonfermentatif gram negatif bakterilerde yapılan az sayıda çalışmada genellikle tüm dünyada en yaygın bulunan IMP ve VIM tipi enzimler araştırılmıştır. Bahar ve ark. (4) imipeneme dirençli bir *P. aeruginosa*'da, Poirel ve ark. (128) da bir *P. putida* izolatında VIM-5 tipi MBL bulmuşlar; Özgümüş ve ark. (124) ise *Pseudomonas* izolatlarında VIM ve IMP tipi MBL genlerini saptamışlar ve sekanslama ile IMP-1'in klonal yayıldığını göstermişlerdir. Çakar ve ark. (109) seftazidim ve/veya imipeneme dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %10'unda *blaVIM* genini; Yakupoğulları ve ark. (129) da kistik fibrozlu bir hastadan izole ettikleri çok ilaca dirençli bir *P. aeruginosa* izolatında *blaPER-1* ve *blaVIM-2*'nin birlikte bulunduğunu saptamışlardır. Irak'tan Türkiye'ye gelen lösemi hastasının kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae*'de *blaNDM-1*'in tespit edilmesi küreselleşen dünyamızda direnç probleminin yaygınlaştığını göstermektedir (130). Bu nedenle çalışmalarda VIM ve IMP dışı diğer MBL genlerinin de göz önünde bulundurulması uygun bir yaklaşım olacaktır.

Çalışmamızda epidemiyolojik yayılım ve klinik ilişki açısından önemli olan IMP, VIM, SPM ve NDM tipi enzimlerin genlerini saptayan primerler kullanıldı (3, 91). Toplam 70 izolatın 3'ünde (%4,2) *blaIMP*, 33'ünde (%47,1) *blaVIM* genine özgül bantlar saptandı; *blaIMP* pozitif izolatların *Pseudomonas* türlerine, *blaVIM* pozitif izolatların ise *Acinetobacter* türlerine ait olduğu belirlendi. *Pseudomonas* türlerinde *blaIMP* sıklığı %8,5, *Acinetobacter* türlerinde *blaVIM* sıklığı %94,2 bulundu. İzolatların hiçbirinde *blaNDM* ve *blaSPM* genlerine özgül bantlar saptanmadı.

PCR ile *blaIMP* pozitifliği saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi'nden gönderilen yakın tarihli ETA örneklerinden izole edilmesi; üç hastanın da aynı suş ile enfekte olduğunu düşündürdü. İzolatların 3'ü de imipenem, meropenem ve seftazidime dirençli; kolistin, siprofloksasin ve levofloksasine duyarlı olup; 2'si azteronama duyarlı, diğeri dirençli bulundu, hiçbiri çok ilaca dirençli değildi (Tablo-6). İzolatların tümünde Etest ve MHT dışında diğer fenotipik testlerle MBL pozitifliği saptandı (Tablo-8).

PCR ile *blaVIM* pozitifliği saptanan *Acinetobacter* suşları değişik kliniklerden gönderilen farklı örneklerden izole edilmişti. Tümünün imipenem, meropenem, seftazidim ve piperasilin-tazobaktama dirençli; %87,8'inin çok ilaca dirençli olduğu saptandı (Tablo-5). PCR ile *blaVIM* geni saptanan izolatların 28'inde Etest ile, 14'ünde MHT ile, 13'ünde ÇDST ile ve 5'inde KDT ile MBL pozitifliği bulundu. Tüm fenotipik testlerin birlikte MBL pozitifliği saptadığı hiçbir *Acinetobacter* suşuna rastlanmadı (Tablo-7).

Bu çalışma hastanemizde nonfermentatif gram negatif bakterilerde MBL varlığını gösteren ilk çalışmadır. *Acinetobacter* suşlarında saptanan yüksek *blaVIM* prevalansı (%94,2) klonal ilişkiyi düşündürmekle birlikte sağlıklı epidemiyolojik veriler için izolatların genotipik benzerliğinin analiz edilmesi gerekmektedir.

Picao ve ark. (90) optimal MBL tarama testi seçiminde bakteri türlerinin ve MBL üreten bakterilerin lokal prevalansının önemini vurgulamışlardır. Çalışmamızda PCR sonuçları ile en uyumlu fenotipik testler *Pseudomonas* izolatları için IMP-EDTA ÇDST (duyarlılık %100, özgüllük %96); *Acinetobacter* izolatları için ise Etest (duyarlılık %84,8; özgüllük %50) bulunmuştur. Pek çok değişkenin (bakteri türü, uygulanan yöntem, MBL tipi ve prevalansı, çalışan kişi vb.) sonuçları etkilediği fenotipik testlerin, moleküler yöntemlerle mutlaka doğrulanması gerekse de yapılamadığı durumlarda hastanemizde *Pseudomonas* izolatları için IMP-EDTA ÇDST, *Acinetobacter* izolatları için Etest uygun fenotipik yöntemler olarak önerilebilir.

MBL üreten bakteri enfeksiyonlarının tedavi seçenekleri kısıtlı olduğundan bu enzimlerin erken saptanması, izolasyon önlemlerinin alınarak dirençli mikroorganizmaların kontrolünü sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Essack SY. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. *Pharm Res* 2001;18:1391-9.
2. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007;74:1686-701.
3. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011;11:381-93.
4. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, et al. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:282-3.
5. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.
6. Vahapoğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 2175-86.
7. Çaylan R. Çok ilaca dirençli hastane kökenli gram negatif nonfermentatif bakteriler: ülkemizdeki durum, tedavi ve kontrol politikaları. *Klimik Derg* 2003;16:18-20.
8. Malini A, Deepa EK, Gokul BN, Prasad SR. Nonfermenting gram negative bacilli infections in a tertiary care hospital in Kolar, Karnataka. *J Lab Physicians* 2009;1:62-6.
9. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. In: WilkeTopçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 2195-201.
10. Çıragil P. *Pseudomonas* ve ilişkili bakteriler. In: Murray PR, Rosenthal KS ve Pfaller MA (eds). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010. 333-41.
11. Saiman L, Siegel J; Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 2003;31:22.
12. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251-4.
13. Şener B. *Pseudomonas*. In: Başustaoğlu A (çeviri editörü). *Klinik Mikrobiyoloji*. 9. baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009. 734-48.
14. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-65.
15. Zarakolu P. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* ve diğer nonfermentatif gram negatif basiller. In:

- Başustaoğlu A (çeviri editörü). Klinik Mikrobiyoloji. 9. baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009. 770-802.
16. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(10):3471-84.
 17. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006;14:413-20.
 18. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 266-78.
 19. Sakarya S. Sefalosporinler. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 278-88.
 20. Şenol E. Karbapenemler ve monobaktamlar. In: Wilke Topçu A, Söyletir G ve Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 288-93.
 21. Şenol E. Karbapenemlerin yeni açılımları. *Ankem Derg* 2009;23(Ek 2):14-6.
 22. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007;67(7):1027-52.
 23. Başaran S, Korten V. Doripenem: klinik uygulamada yeni bir karbapenem. *Klimik Derg* 2010;23(1):2-5.
 24. Gülay Z. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 227-43.
 25. Georgopapadakou NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2045-53.
 26. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 243-57.
 27. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
 28. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-76.
 29. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1766-71.
 30. Wang Z, Fast W, Benkovic SJ. On the mechanism of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 1999;38:10013-23.
 31. Bellais S, Mimoz O, Leotard S, et al. Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2032-4.

32. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51.
33. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:71-8.
34. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, et al. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612-5.
35. 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;39:824-9.
36. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:349-53.
37. Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003;41:5407-13.
38. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2023-7.
39. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1343-8.
40. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi H, et al. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2014-6.
41. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:710-4.
42. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999;353:899-900.
43. Da Silva GJ, Correia M, Vital C. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215:33-9.
44. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:255-8.
45. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a

- clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2368-71.
46. Xiong J, Hynes MF, Ye H, et al. blaIMP-9 and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:355-8.
 47. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1522-8.
 48. Pagani L, Colinson C, Migliavacca R, et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase. J Clin Microbiol 2005;43:3824-8.
 49. Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C. First organisms with acquired metallo- β -lactamases (IMP-13, IMP-22 and VIM-2) reported in Austria. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2221-2.
 50. Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem resistant gram negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. Int J Antimicrob Agents 2008;32:475-80.
 51. Koh TH, Khoo CT, Tan TT, et al. Multilocus sequence types of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo- β -lactamase genes, including the novel blaIMP-26 gene. J Clin Microbiol 2010;48:2563-4.
 52. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1584-90.
 53. Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM. In 70 of plasmid pAX22, a blaVIM-1 containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1249-53.
 54. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD. Nosocomial infections caused by multidrug resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. J Clin Microbiol 2002;40:4051-5.
 55. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, et al. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol 2003;41:3893-6.
 56. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of blaVIM-1 producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48:167-72.
 57. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. First detection of a carbapenem hydrolyzing metalloenzyme in an *Enterobacteriaceae* isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4929-30.
 58. Giske CG, Libisch B, Colinson C, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1 like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas*

- aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2006;44:4309-15.
59. Yildirim I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo- β -lactamase in a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended spectrum β -lactamase. J Chemother 2007;19:467-8.
 60. Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:891-7.
 61. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, et al. First isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1433-4.
 62. Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR. blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2636-8.
 63. Lepsanovic Z, Libisch B, Tomanovic B, Nonkovici Z, Balogh B, Fūzi M. Characterisation of the first VIM metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. Acta Microbiol Immunol Hung 2008;55:447-54.
 64. Samuelsen O, Buarø L, Toleman MA, et al. The first metallo- β -lactamase identified in Norway is associated with a TniC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:331-2.
 65. Pitout JD, Revathi G, Chow BL, et al. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect 2008;14:755-9.
 66. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, et al. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2224-8.
 67. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleki LS, Maniatis AN. Novel variant (blaVIM-4) of the metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:4026-8.
 68. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:648-50.
 69. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). J Antimicrob Chemother 2004;53:451-6.

70. Poirel L, Ros A, Carricajo A, et al. Extremely drug resistant *Citrobacter freundii* identified in a patient returning from India and producing NDM-1 and other carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;55:447-8.
71. Midilli K, Aygün G, Kuşkucu M, ve ark. Bir *K. pneumoniae* kökeninde saptanan yeni bir metallo-beta-laktamaz varyantı: VIM-5. XI.KLİMİK Kongresi, İstanbul,2003. Bildiri no:S-21.
72. Koh TH, Wang GCY, Sng LH. IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent *Pseudomonas* isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2334-6.
73. 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;48:329-32.
74. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, et al. Outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004;42:5094-101.
75. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB type extended spectrum β -lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1265-8.
76. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, et al. Novel variant blaVIM-11 of the metallo- β -lactamase blaVIM family in a GES-1 extended spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:474-5.
77. Khosravi Y, Tee Tay S, Vadivelu J. Metallo- β -lactamase-producing imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:294-6.
78. Lin YC, Sheng WH, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Li SY. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:439-43.
79. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:673-9.
80. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:582.
81. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. 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;53:5046-54.

82. Muir A, Weinbren MJ. New Delhi metallo-beta-lactamase: a cautionary tale. *J Hosp Infect* 2010;75:239-40.
83. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;25:59.
84. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2253-4.
85. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR 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.
86. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1699-701.
87. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug resistant non fermenting Gram negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:111-20.
88. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1978;7:102-3.
89. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th information supplement, (M100-S19). Wayne PA: CLSI, 2009.
90. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, et al. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM, SPM or VIM producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2028-37.
91. Poirel L, Walsh TR, Cuvilliera V, Nordmanna P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119-23.
92. McGowan JE. Resistance in nonfermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 2006;119:29-36.
93. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:S146-55.
94. Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;63:217-22.
95. Wang H, Chen M, Ni Y, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates from the Chinese Meropenem Surveillance Study (CMSS), 2003–2008. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:227-34.
96. Kunz AN, Brook I. Emerging resistant gram negative aerobic bacilli in hospital acquired infections. *Chemotherapy* 2010;56:492-500.

97. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
98. Queenan AM, Pillar CM, Deane J, et al. Multidrug resistance among *Acinetobacter* spp. in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL surveillance 2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:267-70.
99. Gur D, Hascelik G, Aydin N, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother.* 2009;21:383-9.
100. Öksüz L, Gürler N. Klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında kolistin, polimiksin b ve tigesiklinin in vitro etkinliği. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012;42:32-8.
101. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in gram negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:380-8.
102. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al 2000. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase producing gram negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40-3.
103. Aktaş Z, Bal Kayacan Ç. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008;40:320-5.
104. Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N ve ark. İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2011;41(1):29-36.
105. Qu T, Zhang J, Wang J, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* 2009;47:1136-42.
106. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini, G, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000;31:1119-25.
107. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623-9.
108. Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo- β -lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2007;45:2798-801.
109. Çakar A. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması (Doktora Tezi). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005.

110. Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 metallo- β -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol 2008;46:346-9.
111. Collis C, Kim M, Partridge S. Characterization of the class 3 integron and the site specific recombination system it determines. J Bacteriol 2002;141:3017-26.
112. Dağı H, Kuş H, Keyik Ş, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D. Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. ANKEM Derg 2012;26(4):187-92.
113. Çıkman A, Berktaş M, Bektaş A, Özkaçmaz A, Yaman G. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. Van Tıp Dergisi 2011;18(3):132-5.
114. Conejo MC, Garcia I, Martinez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2313-5.
115. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J Clin Microbiol 2012;50:3877-80.
116. K Lee, Y Chong, HB Shin, et al. Modified Hodge and EDTA disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7:88-91.
117. Oh EJ, Lee S, Park YJ, et al. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. J Microbiol Methods 2003;54:411-8.
118. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. J Clin Microbiol 2011;49:4301-3.
119. Borsa BA. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi (Uzmanlık Tezi). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.
120. Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının araştırılması. ANKEM Derg 2011;25(3):150-6.
121. Sesli Çetin E, Tetik T, Kaya S, Ciciođlu Arıdoğan B. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2009;23(2):51-5.
122. Walsh TR, Balmström A, Owarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002;40:2755-9.

- 123.Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2005;56:598.
- 124.Özgümüş OB, Caylan R, Tosun İ, Sandallı C, Aydın K, Köksal İ. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microbial Drug Res. 2007;133:191-8.
- 125.Toraman ZA, Yakupogulları Y, Kizirgil A. Detection of metallo-beta-lactamase production and antibiotic resistance with Etest method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains in Turkey. J Infect Chemother 2004;10:257-61.
- 126.Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden elde edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:248-52.
- 127.Juretschko S, LaBombardi VJ, Lerner SA, Schreckenberger PC and the *Pseudomonas* AST study group. Accuracies of β -lactam susceptibility test results for *Pseudomonas aeruginosa* with four automated systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). J Clin Microbiol 2007;45:1339-42.
- 128.Poirel L, Yakupogulları Y, Kizirgil A, Doğukan M, Nordmann P. VIM-5 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas putida* from Turkey. Int J Antimicrob Agents 2009;33:287.
- 129.Yakupogulları 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.
- 130.Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:2784-5.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresinde bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Okan Töre ve Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na; her konuda yardımını, bilgisini ve cömertliğini esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Güher Göral'a, bilimsel ve analitik düşünme konusunda bakış açımı zenginleştiren değerli hocam Prof. Dr. Beyza Ener'e, mesleki vizyonunu ve çok yönlü kişiliğini örnek aldığım, tezimin oluşmasında ve eğitimim boyunca destek ve bilgilerini her daim sunan kıymetli hocam Prof. Dr. Cüneyt Özakin'a, asistanlığım boyunca bana yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. H. Barbaros Oral, Doç. Dr. Melda Sınırtaş, Doç. Dr. Ferah Budak, Doç. Dr. Oktay Alver'e; mesleğimin klinik ayağı ile ilgili bilgilerimin olgunlaşmasında faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Safiye Helvacı, Prof. Dr. Reşit Mıstık, Prof. Dr. Halis Akalın, Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç. Dr. Emel Yılmaz, Uzm. Dr. Esra Kazak'a; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Burcu Dalyan Cilo, Uzm. Dr. Saliha Sanem Geçgel, Uzm. Dr. Özdemir Özkan, Dr. Bülent Özbek, Dr. Tuncay Topaç, Dr. Ece Gülşah Özmerdiven, Dr. Sezcan Sağlam ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm asistanlarına; laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı çalışma arkadaşlarım Sıdıka Aşıcı, Nuran Akgül, Aynur Demirbilek, Raziye Ülker, Cahide Güçlütürk, Figen Aymak, Şebnem Gedikli, Ayşe Taşpınar, Eda Öztürk, Pınar Yıldız, Elif Uğurgün, Ali Şahin, Tezcan Şahin, Burcu Çakır, Ömer Faruk Birinci, Asuman Dartar, Göknur Altındış, Kemal Halis, İlknur Akgöğ'e, kişiliğini ve yardımseverliğini takdir ettiğim sevgili biyolog Bekir Akça'ya; tanımaktan mutluluk duyduğum anabilim dalımızın diğer öğretim üyeleri, teknisyen, biyolog ve sevgili personeline; çalışmada kullandığımız pozitif kontrol suşlarının teminindeki yardımlarından dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zeynep Gülay'a,

Ayrıca tüm hayatım boyunca her türlü emeğini, desteğini ve sevgisini koşulsuz sunan canım anneme ve babama, tanıştığımız andan itibaren beni benden daha fazla düşünen çok kıymetli yol arkadaşım, meslektaşım, sevgili eşim Uzm. Dr. Fatih Dinç'e ve hayatımıza girdiği andan itibaren yaşamımızı anlamlandıran biricik yavrumuz Elif Defne Dinç'e sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun hızlı destek projesi [HDP (T-2012-35)] tarafından desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Fatma Tuğba

Soyadı: Dinç

Doğum yeri ve tarihi: Ortaköy, 22.02.1982

Eğitimi:

2007-2012 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.- Bursa

2000-2006 İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi - İstanbul

1993-2000 Biga Atatürk Anadolu Lisesi - Biga

1988-1993 Diyarbakırlı Ekrem Ergün İlkokulu - Biga

Yabancı dili: İngilizce