



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN
ACINETOBACTER BAUMANNII* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA
SUŞLARINDA KARBAPENEM HETERODİRENCİ VARLIĞININ
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Ekin KIRBAŞ

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN
ACINETOBACTER BAUMANNII* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA
SUŞLARINDA KARBAPENEM HETERODİRENCİ VARLIĞININ
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Ekin KIRBAŞ

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2023

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Banu SANCAK

TEŞEKKÜR

Tezimin çalışmalarını ve yazımını bitirmiş olmamın verdiği mutluluk ve huzuru sözcüklerle ifade etmek oldukça zor... Uzun süren tez sürecimin iyi ve kötü günlerinde yanımda olan herkese çok teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında, her zaman yanımda olan tez danışmanım, sevgili hocam Prof. Dr. Banu SANCAK'a minnet duyuyorum. Banu Hoca'm bir tez danışmanı olmaktan öte, asistanlık sürecim boyunca hem tüm engin mesleki bilgilerini benimle paylaşmış hem de bana manevi olarak destek olmuş ve sevgiyle yaklaşmıştır. Kendisinden mesleki ve insani yönlerden öğrendiklerim devasadır, kendisine saygım ve sevgim sonsuzdur.

Beş yıl boyunca, mesleki bilgi ve tecrübelerimden yararlandığım kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Özgen ESER, Prof. Dr. Burçin ŞENER ve Prof. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ'a ve bölümümüzdeki diğer tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın moleküler testlerinde kullandığım pozitif kontrol suşlarını benimle paylaşan Dr. Patrice NORDMANN'a ve özellikle suşların transferinin gerçekleşmesini sağlayan Dr. Abdullah TOZLUYURT'a teşekkür ederim. Tezimin çalışmalarını yaparken tecrübelerini benimle paylaşan ve bana yardımcı olan Teknisyen Nejla KILIÇ'a, Teknisyen İrfan ATMACA'ya ve dolaylı yoldan bana hep iyiliği dokunan Personel Yücel OCAK'a teşekkür ederim. Tezimin sonuçlarının istatistiksel analizinde yardım ettiği için Arş.Gör. Merve KAŞIKÇI ÇAVDAR'a teşekkür ederim.

Araştırma görevlisi arkadaşlarım; Öznur GÜRPINAR'a, İlke TOKER ÖNDER'e, Şeyma Aybüke ÖZYAR KURTÇU'ya, eş kıdemlim Neşe İNAL'a, Aylin İrem OCAKLI'ya, Berke KURUMANASTIRLI'ya ve Aytekin FIRTINA'ya asistanlığım boyunca, tüm iyi ve kötü günlerimde yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Ve son olarak... Değerli aileme; annem Gonca KIRBAŞ'a ve babam Cevat KIRBAŞ'a bana daima sevgi, sabır ve anlayış gösterdikleri için ve her an, her koşulda arkamda oldukları için minnettarım.

Ekin KIRBAŞ

27 Mayıs 2023-Ankara

ÖZET

Heterodirenç (HD) ilk kez 1947 yılında *Haemophilus influenzae*'da saptanmasının ardından, birçok bakteri türünde ve farklı antibiyotiklere karşı tespit edilmiştir. Genel anlamda heterodirenç; duyarlı bir bakteri popülasyonu içinde farklı duyarlılıklara sahip bakteri alt popülasyonlarının varlığı olarak tanımlanmaktadır. Heterodirenç sayesinde bakterinin ortamdaki bakterisidal antibiyotik maruziyetinden etkilenmemesinin yanı sıra, heterodirençin bakteride evrimsel olarak antibiyotik direnci gelişiminde bir ara evre olabileceği düşünülmektedir. Çoklu ilaca dirençli ve tüm ilaçlara dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyon prevalansının giderek arttığı günümüzde, pek çok bakteri türünde birçok antimikrobiyale karşı yüksek HD prevalansı bildirilmesi, bu hipotezi desteklemektedir.

Çalışmamıza; Ocak 2014-Temmuz 2018 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 256 *A.baumannii* ve 152 *P.aeruginosa* olmak üzere, toplam 408 non-fermentatif bakteri dahil edilmiştir. İzolatların imipenem (İMP) ve meropenem (MEM) duyarlılıkları, sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda CLSI sınır değerlerine göre; 256 *A.baumannii* izolatının %11,3'ü (s=29) İMP-duyarlı, %0,4'ü (s=1) İMP "intermediate" %88,3'ü (s=226) İMP-dirençli; MEM için %11,7'si (s=30) MEM-duyarlı, %0,8'i (s=2) MEM "intermediate", %87,5'i (s=224) MEM-dirençli olarak saptanmıştır. *P.aeruginosa* izolatlarına ait SMD sonuçları incelediğinde ise; 152 izolatın İMP için %37,5'i (s=57) duyarlı, %19,1'i (s=29) "intermediate" ve %43,4'ü (s=66) dirençli iken; MEM için %38,1'i (s=58) duyarlı, %15,1'i (s=23) "intermediate" ve %46,8'i (s=71) dirençli olarak tespit edilmiştir.

SMD testi ile İMP veya MEM duyarlı olduğu saptanan izolatlarda İMP ve MEM HD varlığı disk difüzyon testi, antibiyotik gradiyent testi ve popülasyon analizi profili (PAP) testi uygulanarak araştırılmıştır. *A. baumannii* izolatlarında İMP-HD sıklığı %24,1, MEM-HD sıklığı %30; *P. aeruginosa* izolatlarında İMP-HD sıklığı %57,9, MEM-HD sıklığı %13,8 olarak bulunmuştur.

Karbapenem direnç epidemiyolojisini belirlemek amacıyla, SMD testi ile karbapenem duyarlı olmadığı saptanan suşlarda karbapenemaz genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılmıştır. Karbapenem-dirençli *A.baumannii*

izolatlarının hepsinde *bla*_{OXA-51} saptanmış, %86,3'ünde (s=195) *bla*_{OXA-23}, %0,9'unda (s=2) *bla*_{OXA-24}, %0,9'unda (s=2) *bla*_{OXA-58} ve %0,9'unda (s=2) *bla*_{NDM} genleri amplifiye edilmiştir. Karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının %4.2'sinde (s=3) *bla*_{IMP}, %26,8'inde (s=19) *bla*_{OXA-10} ve %1,4'ünde (s=1) *bla*_{OXA-2} belirlenmiştir.

Heterodirenç varlığının genotipik yöntemlerle araştırılması amacıyla; HD'li olduğu tespit edilen izolatlarda karbapenemaz genlerinin varlığı, PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Karbapenem-dirençli *A.baumannii* alt popülasyonlarının tümünde *bla*_{OXA-51} geni, %75'inde (s=12) *bla*_{OXA-23} geni saptanmıştır. Karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* alt popülasyonlarının hiçbirinde karbapenemaz genleri amplifiye edilmemiştir.

Heterodirençli bakteri popülasyonlarının özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde persistan ve tekrarlayan enfeksiyonlara yol açabilmesi sebebiyle HD'li bakterilerin saptanması klinik açıdan büyük öneme sahiptir. HD tespitinde altın standart yöntem olduğu kabul edilen PAP testi, zaman alıcı ve emek yoğun bir test olması nedeniyle rutin hizmet veren mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılmamaktadır. Literatürdeki çalışmalarda difüzyon testlerinin rutin hizmet veren mikrobiyoloji laboratuvarlarında HD tespitinde kullanılabileceği belirtilmesine rağmen çalışmamızda difüzyon temelli testlerin düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, günümüzde hala HD'li izolatlarının saptanması amacıyla kullanılabilecek, PAP testi dışında güvenilir bir test bulunmamaktadır.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenem, heterodirenç

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje Birimi (TSA-2019-17898)

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belgesi Sayı Numarası: 16969557-839

ABSTRACT

Since heteroresistance (HR) was first detected in *Haemophilus influenzae* in 1947, it has been described in many bacterial species and against different antibiotic classes. Briefly, HR is defined as the presence of bacterial subpopulations with different susceptibilities within a susceptible bacterial population.

In addition to the fact that heteroresistance protects the bacteria from the effect of bactericidal antibiotic exposure, HR may also be an evolutionary intermediate stage in the development of antibiotic resistance in bacteria. With the increasing prevalence of infections caused by multidrug and pandrug resistant bacteria, the presence of high prevalence of heteroresistance against different antimicrobials in many bacterial species supports this hypothesis.

A total of 408 non-fermentative bacterial strains (256 *A.baumannii* and 152 *P.aeruginosa* strains) isolated from the blood cultures sent to The Central Bacteriology Laboratory of Hacettepe University Hospital between January 2014 and July 2018, were included in the study. Imipenem (IMP) and meropenem (MEM) susceptibilities of the isolates were determined by broth microdilution (BMD) method. In our study, according to the CLSI susceptibility breakpoints; 11.3% (n=29) of 256 *A.baumannii* isolates were found as IMP-susceptible, 0.4% (n=1) as IMP “intermediate” and 88.3% (n=226) as IMP-resistant; 11.7% (n=30) of the isolates were found as MEM-susceptible, 0.8% (n=2) as MEM “intermediate”, and 87.5% (n=224) as MEM-resistant. Of the 152 *P.aeruginosa* isolates, 37.5% (n=57) were found as IMP-susceptible, 19.1% (n=29) as IMP “intermediate” and 43.4% (n=66) as IMP-resistant; 38.1% (n=58) of the isolates were found as MEM-susceptible, 15.1% (n=23) as MEM “intermediate” and 46.8% (n=71) as MEM-resistant.

The presence of carbapenem HR was investigated in the isolates which were determined as IMP or MEM susceptible by BMD test. HR was investigated by disc diffusion, antibiotic gradient test and population analysis profiling (PAP) method. In our study, the rates of IMP-HR and MEM-HR in *A.baumannii* isolates were found as 24.1% and 30%, respectively. However, in *P.aeruginosa* isolates the rate of IMP-HR was 57.9% and MEM-HR was 13.8%.

In order to determine the epidemiology of carbapenem resistance in carbapenem-resistant strains, the presence of carbapenemase genes was investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. *bla*_{OXA-51} was detected in all carbapenem-resistant *A.baumannii* isolates. Although, *bla*_{OXA-23} was detected in 86.3% (n=195), *bla*_{OXA-24} in 0.9% (n=2), *bla*_{OXA-58} in 0.9% (n=2) and *bla*_{NDM} in 0.9% (n=2) of carbapenem-resistant *A.baumannii* isolates. In carbapenem-resistant *P.aeruginosa* isolates, *bla*_{IMP} was detected in 4.2% (n=3), *bla*_{OXA-10} in 26.8% (n=19) and *bla*_{OXA-2} in 1.4% (n=1) of.

In order to determine the presence of heteroresistance by genotypic methods, the presence of carbapenemase genes in carbapenem-resistant subpopulations was investigated by PCR. In carbapenem-resistant *A.baumannii* subpopulations, *bla*_{OXA-51} was detected in %100 and *bla*_{OXA-23} was amplified in 75% of the isolates. Carbapenemase genes were not amplified in carbapenem-resistant *P.aeruginosa* subpopulations.

Detection of HR is of great clinical importance, as heteroresistant bacterial populations can cause persistent and recurrent infections, especially in immunocompromised individuals. The PAP test, which is accepted as the gold standard method for HR detection, can not be applied in routine microbiology laboratories as it is a labor-intensive and laborious test. Although in some of the studies, using diffusion tests was recommended for detection of HR in routine microbiology laboratories, in our study the sensitivity and specificity of diffusion based tests were found too low for detection of carbapenem HR. Therefore, there is still no reliable test other than PAP method that can be used to detect HR isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem, heterogenous resistance

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
<i>Acb</i> kompleks	<i>Acinetobacter calcoaceticus baumannii</i> kompleks
ADC	<i>Acinetobacter</i> -derived cephalosporinase
ADT	Antibiyotik duyarlılık testi
AME	Aminoglikozid modifiye edici enzim
ATCC	American Type Culture Collection
BAP	Biofilm associated protein
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ÇİD	Çoklu ilaca dirençli
DD	Disk difüzyon
DMP	İlaca özgül dış membran proteinleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Fe	Demir
G. Amerika	Güney Amerika
GES	<i>Guiana extended spectrum</i>
GIM	German imipenemase
HD	Heterojen direnç, heterodirenç
İMP	İmipenem
K. Amerika	Kuzey Amerika
KDE	Kan dolaşımı enfeksiyonu
Kİ-KDE	Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolisakkarit
LTD-KDE	Laboratuvar tarafından doğrulanmış primer kan dolaşımı enfeksiyonu
MBL	Metallo-β-laktamaz
MEM	Meropenem

Kısaltma	Açıklama
MGE	Mobil genetik elemanlar
MurA1	UDP-N-asetilglukozamin enolpirüvil transferaz
NDM	New Delhi metallo- β -laktamaz
NPD	Negatif prediktif değer
OMP	Outer membrane protein
OMV	Outer membrane vesicule
OXA	Oxacillinase
PAP	Popülasyon analizi profili
PBP	Penisilin bağlayan protein
PLC	Fosfolipaz C
PPD	Pozitif prediktif değer
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RND	Resistance-nodulation-cell division
<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase β-subunit gene</i>
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
s	Sayı
SHİE	Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyon
SMD	Sıvı mikrodilüsyon
TBE	Tris-borik asit-etilendiamin tetraasetik asit
TE	Tris-etilendiamin tetraasetik asit
TNP	Tekli nükleotid polimorfizmi
UDP	Üridin difosfat
VIM	Verona integron mediated metallo- β -laktamase
Zn	Çinko

BİRİMLER VE SİMGELER DİZİNİ

Birim ve Simge	Açıklama
+2	+2 değerlikli katyonik form
±	Artı-eksi işareti
%	Yüzde
kob	Koloni oluşturan birim
µg	Mikrogram
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
M	Molar
°	Santigrat derece, Celsius
pH	$-\log_{10}[\text{H}^+]$
Rpm	Revolutions per minute

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1	Metallo- β -laktamaz enzimleri hakkında bilgiler	22
3.1	<i>A.baumannii</i> ve <i>P.aeruginosa</i> izolatları için EUCAST ve CLSI kılavuzlarında yer alan imipenem ve meropenem minimum inhibitör konsantrasyon duyarlılık sınır değerleri	26
3.2	<i>A.baumannii</i> ve <i>P.aeruginosa</i> izolatları için EUCAST ve CLSI kılavuzlarında yer alan imipenem ve meropenem inhibisyon zon çapı duyarlılık sınır değerleri	27
3.3	Çalışmada kullanılan primer dizileri	35
3.4	Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	37
4.1	Çalışmaya dahil edilen bakterilerin izole edildikleri yıllara ve kliniklere göre dağılımı	38
4.2	Çalışmaya dahil edilen bakterilerin izole edildikleri yıllara göre ve CLSI duyarlılık kategorilerine göre dağılımı	40
4.3	Sıvı mikrodilüsyon testi ile belirlenen karbapenem MİK değerlerinin dağılımı	41
4.4	İzolatlarının sıvı mikrodilüsyon testi ile belirlenen imipenem ve meropenem MİK ₅₀ , MİK ₉₀ değerleri ve MİK aralıkları	41
4.5	CLSI kılavuzuna göre karbapenem-duyarlı <i>A.baumannii</i> izolatlarının difüzyon testleri sonuçları ile sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları arasındaki uyumu	43
4.6	CLSI kılavuzuna göre karbapenem-duyarlı <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının difüzyon testleri sonuçları ile sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları arasındaki uyumu	44
4.7	Karbapenem heterodirençli <i>A.baumannii</i> izolatlarına ait PAP ve SMD testleri ile elde edilen sonuçlar	45

Tablo		Sayfa
4.8	Karbapenem heterodirençli <i>P.aeruginosa</i> izolatlarına ait PAP ve SMD testleri ile elde edilen sonuçlar	48
4.9	<i>A.baumannii</i> ve <i>P.aeruginosa</i> izolatlarında PAP testi ile difüzyon temelli test verilerinin karşılaştırılması	51
4.10	Karbapenem-duyarlı izolatların heterodirenç varlığına göre gruplandırılması	52
4.11	Karbapenem dirençli izolatlarda saptanan karbapenemaz genleri	53
5.1	Uluslararası yapılan çalışmalarda <i>A.baumannii</i> izolatlarında saptanan karbapenem direnç oranları	55
5.2	Uluslararası ve Türkiye'den yapılan çalışmalarda <i>P.aeruginosa</i> izolatlarında saptanan karbapenem direnç oranları	56
5.3	<i>A.baumannii</i> ve <i>P.aeruginosa</i> türlerinde karbapenem heterodirencinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen verilerin özeti	61
5.4	Sonuçlarımız farklı HD tanımlama kriterlerine göre değerlendirildiğinde elde edilen karbapenem heterodirenci sıklıkları	65
5.5	Literatürdeki çalışmalarda bulunan stabil ve stabil olmayan heterodirenç sıklıkları	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1	Heterodirençli ve homojen bakteri popülasyonlarının antibiyotik yanıtları	11
2.2	Duyarlı, heterodirençli ve dirençli bakterilerin popülasyon analizi grafiği	12
2.3	Heterodirençin enfeksiyonun gidişatı ve antibiyotik duyarlılık testleri üzerine etkileri	16
2.4	Karbapenemlerin molekül yapıları	18
2.5	β -laktam substratı ve β -laktamaz enzimi ile gerçekleşen iki basamaklı tepkime	21
3.1	Karbapenem HD varlığının araştırılmasında uygulanan akış şeması	28
3.2	Popülasyon analizi profili testinde kullanılan farklı konsantrasyonlara sahip antibiyotik çözeltilerinin hazırlanmasında izlenen akış şeması	30
3.3	Farklı yoğunluklarda bakteri çözeltilerinin hazırlanma şeması	31
3.4	Popülasyon analizi profili testinin uygulanmasında izlenen akış şeması	31
3.5	Heterodirenç stabilitesinin araştırılmasında izlenen akış şeması	32
3.6	Çalışmada kullanılan DNA moleküler ağırlık belirteci	36
4.1	Heterodirençli <i>A.baumannii</i> izolatlarına ait meropenem PAP plağında görülen üreme paterni, imipenem heterodirençli ve meropenem heterodirençli suşlar ile <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 kalite kontrol suşuna ait popülasyon analizi grafiği	45
4.2	İmipenem heterodirençli ve meropenem heterodirençli <i>P.aeruginosa</i> izolatları ile <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 kalite kontrol suşuna ait popülasyon analizi grafiği, PAP plaklarında büyük ve küçük koloniler olmak üzere iki farklı üreme paterni gösteren <i>P.aeruginosa</i> izolatları	47
4.3	Heterodirençli <i>A.baumannii</i> suşlarına ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	54

İÇİNDEKİLER

Başlık	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
BİRİMLER VE SİMGELER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Acinetobacter baumannii ve Pseudomonas aeruginosa Türleri	3
2.1.1. A.baumannii ve P.aeruginosa Türlerine Ait Genel Bilgiler	3
2.1.2. A.baumannii ve P.aeruginosa Türlerinin Virülans Faktörleri	5
2.2. Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar	8
2.2.1. Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Hakkında Genel Bilgiler	8
2.2.2. Sağlık Hizmeti İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonları Hakkında Genel Bilgiler	9
2.2.3. Sağlık Hizmeti İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonu Etkeni Olarak A.baumannii ve P.aeruginosa	10
2.3. Heterodirenç (Heterojen direnç)	11
2.3.1. Heterodirenç Hakkında Genel Bilgiler	11
2.3.2. Çeşitli Antibiyotik Sınıflarına Karşı Heterodirençten Sorumlu Olası Mekanizmalar	12
2.3.3. Heterodirencin Sınıflandırılması	14
2.3.4. Heterodirencin Klinik Önemi	15
2.3.5. Heterodirencin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	16
2.4. Karbapenem Sınıfı Antibiyotikler	17
2.4.1. Karbapenem Sınıfı Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler	17
2.4.2. Karbapenem Sınıfına Dahil Antibiyotikler	18
2.5. Karbapenem Direnci	19
2.5.1. Karbapenem Direnci Hakkında Genel Bilgiler	19
2.5.2. İntrinsik (Doğal) Karbapenem Direnci	20
2.5.3. Kazanılmış Karbapenem Direnci	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. İzolatlar	24
3.2. İzolatların İmipenem ve Meropenem Duyarlılıklarının Belirlenmesi	24
3.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	24
3.2.2. Disk Difüzyon Testi ve Antibiyotik Gradyent Testi	26
3.3. Karbapenem Heterodirenci Varlığının Araştırılmasında Uygulanan Fenotipik Yöntemler	28
3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi	28
3.3.2. Antibiyotik Gradyent Test Yöntemi	29

Başlık	Sayfa
3.3.3. Popülasyon Analizi Profili Yöntemi	29
3.4. Heterodirenç Stabilitesinin Belirlenmesi	32
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenemaz Genlerinin Tespiti	32
3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi Uygulanan İzolatlar	33
3.5.2. EDTA, TE ve TBE Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	33
3.5.3. Bakteriyel DNA'nın İzolasyonu	33
3.5.4. Kullanılan Primer Dizileri ve Primer Çözeltilerinin Hazırlanması	34
3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Karışımlarının Hazırlanması	34
3.5.6. Gen Bölgelerinin Amplifikasyonunda Uygulanan PZR Koşulları	34
3.5.7. Agaroz Jel Elektroforez ile PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	35
3.6. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	38
4.1. İzolatların Kliniklere ve Yıllara Göre Dağılımları	38
4.2. İmipenem ve Meropenem Duyarlılık Sonuçları	39
4.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları	39
4.2.2. Disk Difüzyon Testi ve Antibiyotik Gradyent Test Sonuçları	42
4.3. Popülasyon Analizi Profili Sonuçları	44
4.4. Heterodirençli İzolatların Saptanmasında, Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Testi Sonuçlarının, PAP testi Sonuçları ile Karşılaştırılması	50
4.5. Heterodirenç Stabilitesi Sonuçları	51
4.6. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	52
5. TARTIŞMA	55
6. KAYNAKLAR	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter baumannii ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın canlı ve cansız birçok yüzeyde biyofilm oluşturabilmesi, dezenfektanlara, alkole ve birçok antimikrobiyal ajana karşı intrinsik dirençli olması, diğer bakterilerin canlılıklarını sürdürmedikleri zor şartlarda dahi canlı kalmalarını sağlamaktadır. Hastane ortamında bulunan eşyaların ve tıbbi cihazların yüzeylerine tutunup kolonize olan *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*, bu yüzeylerde hızla oluşturdukları biyofilm içerisinde canlılıklarını sürdürmektedir. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*; nadiren toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilmekle birlikte, özellikle immünsupresif tedavi alan ve yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) tedavi gören, enfeksiyona yatkın hasta popülasyonunda, tedavisi zor sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlara (SHİE) yol açabilen önemli etkenlerdir (1, 2).

Heterodirenç (heterojen direnç, HD), bir antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakteri popülasyonu içinde farklı duyarlılıklara sahip alt popülasyonlarının varlığı olarak tanımlanmaktadır. İlk kez 1947 yılında *Haemophilus influenzae* izolatlarında tanımlanan heterodirenç, bugüne kadar birçok bakteri türünde pekçok antibiyotiğe karşı saptanmıştır. Günümüzde birçok ülkede farklı antibiyotik gruplarına karşı yüksek HD prevalansı bildirilmesine rağmen; ne üzerinde karar birliğine varılmış bir HD tanımı ne de HD tespitinde kullanılacak, standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır (3).

Popülasyon analizi profili (PAP) yöntemi; HD saptanmasında altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, yapılan çalışmalarda farklı yöntemler ve farklı cut-off değerlerinin kullanılıyor olması, elde edilen sonuçların yorumlanmasını ve birbiriyle karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. PAP yönteminin zaman alıcı ve uygulanmasının zor olması nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanamamaktadır. Rutin laboratuvarlarda HD'li izolatların saptanması amacıyla disk difüzyon testi ve antibiyotik gradiyent testlerinin kullanılmasını öneren araştırmalar bulunmakla birlikte bu yöntemler ile PAP testi ile elde edilen sonuçların karşılaştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (4, 5)

Karbapenem sınıfı antibiyotiklerin 1985 yılında klinik kullanıma girmesinden günümüze kadar geçen sürede çoklu ilaca dirençli (ÇİD) gram-negatif bakteri

sıklığının giderek artması, ÇİD bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen ve geniş antimikrobiyal etki spektrumuna sahip karbapenemlerin kullanım sıklığında artışı da beraberinde getirmiştir. Bu durum gerek karbapenem direncini gerekse HD prevalansında artışa yol açmıştır (6).

Çalışmamızda; izolatların karbapenem duyarlılıklarının SMD testi ile belirlenmesi, karbapenem-duyarlı olduğu tespit edilen suşlarda karbapenem HD varlığının fenotipik ve genotipik testlerle araştırılması ve karbapenem-dirençli izolatlarda karbapenemaz genlerinin PZR yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter Baumannii* ve *Pseudomonas Aeruginosa* Türleri

2.1.1. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* Türlerine Ait Genel Bilgiler

A.baumannii

Acinetobacter cinsi bakteriler; suda, toprakta, artropodlar dahil olmak üzere birçok hayvanda ve bitkide olmak üzere doğada yaygın olarak bulunmaktadır. İlk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından kalsiyum asetat mineral yatağından izole edilip *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılan bakteri, sonraki yıllarda Paul Baumann'a ithafen *Acinetobacter baumannii* olarak adlandırılmıştır. *Acinetobacter* cinsi bakteriler önceden *Neisseriaceae* ailesine dahil iken, günümüzde *Moraxellaceae* ailesinde yer almaktadır. Fenotipik ve genotipik olarak birbirine benzeyen (sakkarolitik) altı tür; patojen türler *A.baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii*, *Acinetobacter dijkschoorniae* ve patojen olmayan tür *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* kompleks (*Acb* kompleks) olarak tanımlanmıştır (7).

Acinetobacter türleri.; zorunlu aerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif, sakkarolitik, non-fermentatif, *Moraxellaceae* ailesine ait gram-negatif bir kokobasildir. Hücre duvar yapısından dolayı zor dekolorize olması nedeniyle, Gram boyaması sonucunda yer yer gram-pozitif kok veya kokobasil şeklinde gözükabilir. Kanlı agarda 0,5-2 mm çapında, opak, düzgün yüzeyli, konveks koloniler; Mac Conkey agarda renksiz veya hafif pembe renkli koloniler oluşturabilir (8). İnsanda enfeksiyona en sık sebep olan tür *A.baumannii* olmakla birlikte; *A.pitti*, *Acinetobacter lwoffii*, *A.nosocomialis* gibi diğer patojen türler de nadiren SHİE'lara yol açabilmektedir.

A.baumannii'nin diğer bakterilere kıyasla biyofilm oluşturma olasılığının daha yüksek olması, pek çok antibiyotiğe karşı tolerans göstermesini sağlamaktadır (1). Ayrıca bu bakteride kromozomal yerleşimli *bla_{ADC}* ve *bla_{OXA-51}* genleri arasına *IS_{Aba1}* insersiyon sekansının (IS) eklenmesi, ADC (sefalosporinaz) ve OXA-51 (karbapenemaz) enzim ekspresyonlarının artmasına yol açarak β-laktam direnci gelişimine sebep olabilir (9). *IS_{Aba125}* ve *IS_{Aba825}* gibi daha nadir bulunan IS'ları, bakteri kromozomundaki porin kodlayan genlerin arasına insersiyon sağlayarak, porin

inaktivasyonuna ve böylece karbapenem direnci, özellikle imipenem direnci, gelişmesine yol açabilir.

P.aeruginosa

Pseudomonas cinsi bakteriler, ilk kez 1894 yılında Migula tarafından tanımlanmıştır (10). 1970'li yıllarda, RNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Pseudomonas* cinsinin beş rRNA homoloji grubundan oluştuğu belirlenmiştir. Hololoji grubu I'de *Pseudomonas* türleri, homoloji grubu II'de *Burkholderia* türleri; homoloji grubu III'te *Comamonas*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga* türleri; homoloji grubu IV'te *Brevundimonas* türleri; homoloji grubu V'te *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* türleri bulunmaktadır. *Pseudomonas* cinsi içinde 160 tür bulunmasına rağmen yalnız 12 tür klinik öneme sahiptir.

Pseudomonas türleri aerob, katalaz pozitif, oksidaz pozitif, hareketli, sakkarolitik, non-fermentatif, *Pseudomonadaceae* ailesine ait gram-negatif bir basildir. *Acinetobacter* cinsi bakteriler gibi doğada yaygın olarak bulunan bu bakteriler, 4-36°C arasında değişen sıcaklıklarda üreyebilir. İnsanda enfeksiyona en sık yol açan tür *P.aeruginosa*'dır.

P.aeruginosa; dış membranında bulunan porin geçirgenliğinin az olması, kromozomunda birçok dışa atım pompası ve β -laktamaz enzimi kodlayan gen barındırması, diğer bakterilere nazaran çok daha fazla biyofilm oluşturabilmesi sebebiyle birçok antibiyotik sınıfına karşı intrinsik dirençlidir. 'Resistance-nodulation-cell division' (RND) süperailisine ait dışa atım pompaları olan MexAB-OprM ve MexXY-OprM ekspresyonu, *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenemler dahil (imipenem hariç) olmak üzere pek çok antibiyotik sınıfına karşı dirence yol açar. Kromozomal yerleşim gösteren ve bir oksasilinaz enzimi olan OXA-50 de beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı intrinsik dirençten sorumludur. Ayrıca yapısal olarak sentezlenen, indüklenebilir AmpC β -laktamaz enzimi, *P.aeruginosa* izolatlarının ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı intrinsik direncinden sorumludur (11, 12).

2.1.2. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

Hem *A.baumannii* hem de *P.aeruginosa*; halk sağlığı açısından çok tehlikeli olan, yüksek virülansa ve yüksek antimikrobiyal dirence sahip ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) grubu bakteriler arasında kabul edilmektedir.

A.baumannii

Eskiden düşük virülansa sahip, fırsatçı bir patojen olduğu ve bu sebeple yalnızca bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona sebep olabileceği düşünülen *A.baumannii*'nin; günümüzde deprem, sel, tsunami gibi doğal afetler; toplumsal ayaklanmalar, savaş gibi durumlarda toplum kaynaklı enfeksiyonlara ve hastane salgınlarına yol açabilen, karmaşık biyolojik özelliklere sahip bir bakteri olduğu bilinmektedir. Diğer ESKAPE grubu patojenlerin aksine *A.baumannii*'nin virülans faktörleri kesin olarak tanımlanamamış olup; hücre yüzey elemanları, mikrobesein maddelerine erişim, sekresyon sistemleri, genetik plastisite vb. virülans faktörlerinin bir arada patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir.

i. Hücre Yüzey Elemanları

Gram-negatif bakterilerin dış membranında, besin maddeleri, su ve antibiyotik gibi maddelerin hücre içine geçişini sağlayan proteinler (porinler) bulunmaktadır. *A.baumannii*'ye özgü OmpA, CarO, OprD-benzeri, Omp34, OmpW vb. birçok porin tanımlanmıştır. En fazla araştırılmış porin olan OmpA'nın; konak fibronektin molekülüne bağlanma, serum direnci, biyofilm oluşumu, sitotoksisite ve apoptoz indüksiyonu gibi farklı pek çok süreçte görevli olduğu gösterilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı aminoasitlerin ve imipenemin hücre içine geçişini CarO porininin sağladığı; bakterinin konak hücre içinde persistant formda kalmasında Omp34'ün etkili olduğu gösterilmiştir (13).

ii. Esansiyel Minerallere Erişim

Tüm patojen bakteriler, canlı kalabilmek için demir (Fe), çinko (Zn), mangan (Mn) gibi minerallere ihtiyaç gösterir ve bu amaç için çeşitli mineralleri edinim sistemlerine sahiptir. *A.baumannii*'de diğer patojen türlere kıyasla daha fazla sayıda metal şelatörü tanımlanmıştır. Acinetobaktin, fimsbaktin ve baumannoferrin; *Acinetobacter* tarafından üretilen ve hücre dışına salgılanan Fe şelatörleridir.

A.baumannii tarafından hücre dışına salgılanan, lipolitik ve hidrolitik aktiviteye sahip fosfolipaz C ve D enzimleri; konak eritrositlerinin parçalanmasını ve açığa çıkan Fe'nin bakteri tarafından kullanmasını sağlayarak dolaylı yoldan bakteriyeye Fe sağlamaktadır (14).

iii. Sekresyon Sistemleri

A.baumannii'nin çevre ve konak koşullarına uyumunu arttıran diğer bir virülans faktörü, sekresyon sistemleridir. Tip 1 sekresyon sistemi (T1SS) biyofilm üretimi ve idamesinde, pulmoner epitel adezyonunda; Tip 2 sekresyon sistemi (T2SS) hidrolitik aktiviteye sahip enzimlerin sekresyonunda; Tip 4 sekresyon sistemi (T4SS) mobil genetik elemanların transferinde; Tip 5 sekresyon sistemi (T5SS) konak integrin ve fibronektin moleküllerine adezyonda görevlidir (15).

iv. Genetik Plastisite

Antibiyotik direnç mekanizmalarını hızla kazanma yeteneği; *A.baumannii*'nin hastane ortamında yüksek antimikrobiyal maruziyetine rağmen canlı kalmasını sağlamış ve *A.baumannii*'yi tüm dünyada önemli bir patojen haline getirmiştir. *A.baumannii* diğer bakterilere göre nispeten küçük bir kor genoma; pek çok antibiyotik direnç genini ve virülans faktörünü kodlayan büyük bir aksesuar genoma sahiptir. ÇİD'li *A.baumannii* suşlarının kromozomunda birçok antimikrobiyal direnç genini barındıran direnç adalarının varlığı gösterilmiştir. Bununla birlikte; *A.baumannii*'nin kor ve aksesuar genomlarında virülans faktörlerini kodlayan genlerin rekombinasyon, insersiyon veya delesyon yoluyla kendi içinde tekrar düzenlenmeleri; *A.baumannii*'nin genetik plastisiteni arttıran hastane koşullarına adaptasyonunu sağlayan bir diğer faktördür (13, 16).

P.aeruginosa

P.aeruginosa'nın konağa tutunmasını, kolonize olmasını ve ardından enfeksiyona yol açmasını sağlayan birçok virülans faktörü vardır. Hücre yüzey elemanları, enzimler, sekrete edilen moleküller, bakteri hücreleri arası etkileşimler gibi farklı mekanizmalar bakterinin virülansına katkı sağlamaktadır. Bu virülans faktörleri *P. aeruginosa*'yı non-fermentatif gram-negatif basiller arasında en tehlikeli patojenlerden biri haline getirmektedir.

i. Hücre yüzey elemanları

Tip 4 pilus, sitoplazmik ATPaz aktivitesi sayesinde *P.aeruginosa*'nın seğirme "twitching" ve buğu şeklinde yayılma "swarming" hareketlerini yapmasını sağlayan fimbriyadır. Hareket dışında; bakterinin farklı yüzeylere adezyonundan, siklik di-GMP üretimini düzenleyerek biyofilm üretiminden ve direnç genlerinin horizontal yolla transferinden sorumludur. Hareket, kemotaksis, adezyon ve biyofilm üretiminde rol alan diğer bir hücre yüzey elemanı olan flajel, konakta Toll-benzeri reseptör-5 (TLR5) üzerinden doğal bağışıklık yanıtını aktive eder (17).

ii. Sekresyon Sistemleri

P.aeruginosa'da, Apr T1SS ve HasF T1SS olmak üzere iki tip T1SS bulunur. Apr T1SS ve HasF T1SS sırasıyla alkalin fosfatazın ve Fe şelatörlerinin hücre dışına sekresyonundan sorumludur. T2SS ise *P.aeruginosa*'nın majör ekzotoksinlerinin sekresyonunu sağlar. Ekzotoksin A (PEA), Proteaz IV, Elastaz A ve B (LasA ve LasB) toksinlerinin salınımından Xcp T2SS sorumlu iken; düşük molekül ağırlıklı alkalin fosfatazların (LapA ve LapB) sekresyonundan HasF T2SS sorumludur. ExoS, ExoT, ExoU ve ExoY efektörlerinin konak hücre içine enjekte edilmesi T3SS ile gerçekleşirken T5SS adezyonda ve biyofilm üretiminde rol alır (2, 17).

iii. Sekrete Edilen Moleküller

P.aeruginosa'nın ürettiği alginat, Psl ve Pel gibi ekzopolisakkaritler, bakterinin konak bağışık yanıtına karşı toleransını sağlamanın yanı sıra, yüzey adezyonunda ve biyofilm üretiminde de rol alır. Bakterinin Fe şelatörleri olan piyoverdin ve piyokelin, konağa ait Fe atomlarını bakterinin elde etmesini sağlar. T1SS ile hücre dışına salgılanan alkalin proteaz enzimi, kompleman proteinlerinin, TNF α 'nın ve IFN γ 'nın parçalanmasından sorumludur. Elastaz A ve B (LasA, LasB) ise akciğer parankiminde yoğun olarak bulunan elastinin yıkımına neden olur (2, 18).

iv. Toksinler

T3SS ile konak hücresinin içine enjekte edilen ExoS ve ExoT toksinleri, aktin iskeletini bozar ve hücrede apoptozu indükler. ExoU, nekrotik hücre ölümüne yol açan en virülan toksindir. Bakteride indirgenme tepkimesi sonucu oluşan bir metabolit olan piyosiyanin, hücre dışına sekrete edilerek sitotoksik etki gösterir (8, 17).

v. Hücreler Arası Etkileşimler

Quorum-sensing (QS) ve biyofilm oluşumu, *P.aeruginosa*'nın hücreler arası iletişimini sağlayan önemli virülans faktörleridir. Biyofilm; biyotik ve abiyotik yüzeylerde oluşabilen, hücre dışına salgılanan çeşitli polimerik moleküller içeren organik matriks içinde bakterilerin olumsuz çevre koşullarından, konak bağışıklık yanıtından ve antibiyotik etkisinden korunmasını sağlayan çok katmanlı yapılardır. QS, çeşitli kimyasallar ile parakrin ve otokrin yollarla bakteri popülasyonunda popülasyon büyüklüğü, virülans, biyofilm oluşumu vb. birçok süreci transkripsiyonel olarak düzenleyen bir mekanizmadır (2).

2.2. Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar (SHİE)

2.2.1. Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Hakkında Genel Bilgiler

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonu (SHİE) hastanın bakımı sırasında (tıbbi veya cerrahi durumlar için tedavi alırken) hastanede veya diğer bir sağlık kurumunda kazanılan, hastanın kuruma ilk kabulünde bulunmayan veya inkübasyon döneminde olmayan bir enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde sağlık hizmetlerinin kurumlara bağlı olarak çeşitlenmesi, küçük cerrahi işlemlerin hastane yatışı olmadan yapılabilmesi, hastaların tıbbi tedavilerini sağlık kurumlarında günübirlik alabilmeleri sebebiyle daha önceleri 'nozokomiyal enfeksiyon' veya 'hastane enfeksiyonu' olarak adlandırılan durumlar yerine 'sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon' terimi kullanılmaktadır (19).

SHİE'lar tutulan doku ve organ sistemine göre; kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE), kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (Kİ-KDE), ventilatör ilişkili pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları ve üriner kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu olarak sınıflandırılmaktadır. Çocuklarda ve erişkinlerde en sık görülen SHİE olan KDE'ler önemli morbidite ve mortalite sebepleridir. İmmünesupresif tedavi alan, hematolojik malignitesi olan, YBÜ'de tedavi gören ve nötropenisi olan kişiler KDE ve fulminant bakteriyel enfeksiyonlar gelişmesi yönünden risk altındadır (20).

2.2.2. Sağlık Hizmeti İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonları Hakkında Genel Bilgiler

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Rehberi'nde belirtilen kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (Kİ-KDE) tanımları aşağıda sunulmuştur (21).

Laboratuvar tarafından doğrulanmış primer kan dolaşımı enfeksiyonu (LTD-KDE) tanısı konulması için; herhangi yaştaki bir hastada ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), titreme veya hipotansiyon bulgularından en az birinin bulunması ve etkenin başka bir enfeksiyon odağı ile ilişkisinin olmaması ve üreyen mikroorganizma cilt mikrobiyota elemanı ise (*Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp., koagülaz-negatif stafilocoklar) en az iki farklı zamanda alınan iki veya daha fazla kan kültürü şişesinde üretilmiş olması tanı kriterlerini karşılamalıdır. Bir yaşından küçük hastalarda ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), hipotermi ($<36^{\circ}\text{C}$), apne veya bradikardi bulgularının olması ve pozitif laboratuvar sonuçlarının başka bir enfeksiyon odağı ile ilişkisinin bulunmaması ve üreyen mikroorganizma cilt mikrobiyota elemanı ise en az iki farklı zamanda alınan iki veya daha fazla kan kültürü şişesinde üretilmiş olması durumunda LTD-KDE tanı kriterleri karşılanmış olur.

Sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı koymak için; hastada tanı konulan SHİE'nin bölgeye özgü tanı kriterlerinden birini karşılaması (örneğin idrar yolu enfeksiyonu, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonu vb) ve alınan kan kültürlerinden orijinal bölgedeki enfeksiyon etkeni ile eşleşen en az bir mikroorganizma üretilmesi kriterlerinin karşılanması gerekir.

Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (Kİ-KDE), iki günden daha uzun süre santral kateteri olan bir hastada gelişen laboratuvar tarafından doğrulanmış kan dolaşımı enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır.

Doğru zamanda ve yeterli sayıda kan kültürü alınmaması ya da konvansiyonel yöntemlerle üretilmeyen mikroorganizmaların etken olması gibi faktörlerden dolayı KDE olgularının yaklaşık 2/3'ünde etken mikroorganizma saptanabilmektedir. SHİ-KDE enfeksiyonu etkenleri yıllar içinde değişiklik göstermekle birlikte, genel olarak olguların %38-62'sine gram-negatif bakteriler, %40-52'sine gram-pozitif bakteriler, %5-19'une fungal etkenler ve nadiren virüsler sebep olmaktadır (20). Ulusal Sağlık

Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Etken Dağılımı Raporu'nda ülkemizde KDE etkeni olarak %33 oranında gram-pozitif koklar, %34,7 enterik bakteriler ve % 14,5 non-fermentatif gram-negatif bakteriler bildirilmiştir (21).

2.2.3. SHİE Etkeni Olarak *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*

A.baumannii ve *P.aeruginosa* planktonik hücre formundan hızla yüzey-adapte forma geçmeleri ve polistren, poliüretan, polivinilklorid gibi sentetik moleküllerden üretilen tıbbi cihazların yüzeylerinde kolonize olup biyofilm oluşturmaları nedeniyle cihaz ilişkili sağlık hizmeti enfeksiyonlarına en sık yol açan patojenlerdendir.

A.baumannii, kontamine hastane ekipmanlarının yüzeyine ya da kolonize bir hastayla temas yoluyla sağlık personeline bulaşması sonucu sağlık kuruluşlarında yayılarak varlığını sürdürür. Sağlıklı insanlarda kolonize olamayan *A.baumannii*; doğal bağışık yanıtı zayıflamış YBÜ'nde yatan hastalarda deri, solunum ya da genitoüriner sistemde kolonize olur (13). Biyotik yüzeyler dışında poliüretan, polivinilklorid gibi sentetik maddelerden üretilen damar içi kateter ve solunum cihazlarının yüzeylerinde kolonizasyonu takiben doğal vücut bariyerlerini ve doğal bağışıklık yanıtı hücrelerini atlatarak bölgesel veya yaygın enfeksiyonlara sebep olabilir (22).

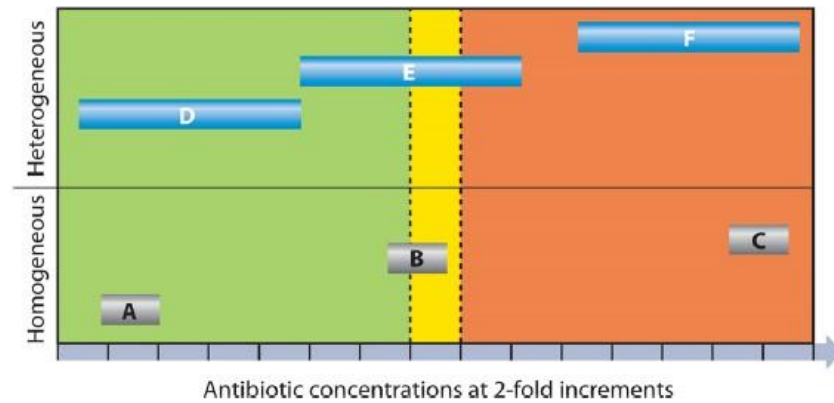
P.aeruginosa; sağlık kuruluşlarında polistren, polivinilklorid, poliüretan gibi sentetik maddelerden üretilen mekanik ventilatör ve solunum cihazı yüzeylerinde, lavabo, musluk, tuvalet ve diyaliz makinelerinin suyla temas eden yüzeylerinde kolonize olur. *P.aeruginosa* sağlıklı kişilerin derisinde kolonize olamazken, termal yanık hastalarında dermal tabakanın hasara uğraması sonucunda uygun bir ortam oluşması nedeniyle kolonizasyon meydana gelebilir. Bu sebeple, yanık hastalarında *P.aeruginosa* en sık görülen bakteriyemi etkenlerinden biridir. Sağlıklı kişilerin gastrointestinal sistem mikrobiyotasında bulunmayan *Pseudomonas*, yoğun antibiyotik tedavisi alan hastaların gastrointestinal sisteminde kolonize olabilmekte ve bu kişilerde otoenfeksiyon yoluyla sepsis gelişimine yol açabilmektedir (23).

2.3. Heterodirenç

2.3.1. Heterodirenç Hakkında Genel Bilgiler

Bakteri popülasyonu içinde farklı antibiyotik duyarlılıklarına sahip bakterilerin varlığı ilk olarak 1947 yılında *Haemophilus influenzae* suşlarında ve ardından *Staphylococcus* izolatlarında fark edilmekle birlikte “heterojen direnç-heterodirenç” olarak isimlendirilmesi 1970 yılında gerçekleşmiştir (24, 25). 1947 yılından günümüze dek heterodirenç; birçok bakteri türünde, pek çok antibiyotiğe karşı saptanmıştır.

Heterodirençin literatürde birçok tanımı bulunmakla birlikte en genel tanımı, bakteri popülasyonu içinde farklı antibiyotik yanıtına sahip alt popülasyonların bulunmasıdır. Homojen bakteri popülasyonlarında, bakteriler *in vitro* antibiyotik duyarlılık testleri ile bir antibiyotiğe karşı, popülasyon içindeki bakteriler arasında MİK farklılığı olmaksızın, **A**) duyarlı, **B**) “intermediate” veya **C**) dirençli olarak sınıflandırılırlar. Heterodirençli bakteri popülasyonlarında ise; **D**) popülasyonun tümü antibiyotiğe duyarlı olmakla birlikte, alt popülasyonlar antibiyotiğin direnç sınır değerinin altındaki farklı antibiyotik konsantrasyonlarında üremeye devam edebilir; **E**) bakteri popülasyonunun çoğunluğu antibiyotiğe duyarlı olmakla birlikte, dirençli alt popülasyonlar bulunur; **F**) bakteri popülasyonu içindeki tüm bakteriler antibiyotiğe dirençli olmakla birlikte, direnç sınır değerinin üstündeki farklı antibiyotik konsantrasyonlarında üreyebilen bakteri alt popülasyonları bulunur (**Şekil 2.1**) (3).

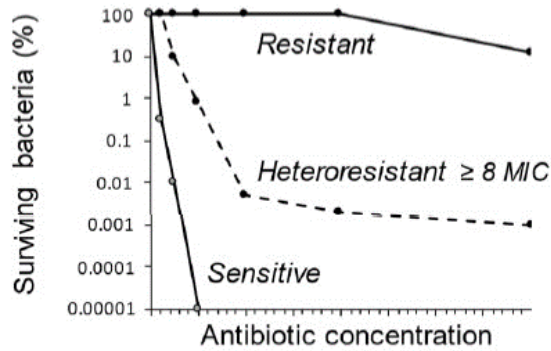


Şekil 2.1. Heterodirençli ve homojen bakteri popülasyonlarının antibiyotik yanıtları (Noktalı çizgiler antibiyotiğin direnç sınır değerini göstermektedir) (3)

Duyarlı bir bakteri popülasyonu içinde her bir bölünme döngüsünde 1×10^{-7} 'den daha az sıklıkta meydana gelen spontan mutasyonlar sonucunda dirençli bakteriler

oluşabilmektedir. Spontan mutasyonlar sonucunda, duyarlı bakteri popülasyonu içinde 1×10^{-7} 'den daha az sıklıkta dirençli bakterilerin bulunması olağan olduğundan duyarlı bir bakterinin heterodirençli olarak tanımlanabilmesi için, koloni içinde 1×10^{-7} 'den daha fazla sıklıkta dirençli bir alt grup mevcut olmalıdır (26).

Popülasyon analizi profili, HD tespitinde altın standart kabul edilen yöntemdir. Artan antibiyotik konsantrasyonlarına karşı plaklarda üreyen koloni sayıları grafik üzerinde çizilerek, bir bakteri popülasyonu içindeki alt grupların antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklar saptanabilmektedir. PAP testi uygulandığında, bir antibiyotiğe dirençli olan bir bakteri yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında üremeye devam ederken, o antibiyotiğe duyarlı bakterilerde MİK değerine karşılık gelen antibiyotik konsantrasyonunda koloni sayısında keskin bir düşüş izlenir ve bakteri koloni sayısı sıfırlanır. HD'li bakterilerde ise dirençli alt popülasyonlar yüksek antibiyotik konsantrasyonu içeren PAP plaklarında üremeye devam ederler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Duyarlı, heterodirençli ve dirençli bakterilerin popülasyon analizi grafiği (27)

2.3.2. Çeşitli Antibiyotik Sınıflarına Karşı Heterodirençten Sorumlu Olası Mekanizmalar

Literatürde heterodirenç yol açan hücresel mekanizmaların belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen kesin bir sonuç elde edilememiştir. Birçok antibiyotik grubuna karşı HD saptanmış olmakla birlikte β -laktam grubu antibiyotikler ve kolistin, HD konusu üzerine en çok çalışılan antibiyotiklerdir.

β -Laktam Heterodirenci: Stafilokoklarda metisilin HD'inden penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a) üretiminde artışın, bakteri hücre duvarında otoliz enzim aktivitesinde değişikliğin ve transkripsiyon düzenleyicileri olan Sar ve Sigma B operonlarının inaktivasyonunun sorumlu olabileceği gösterilmiştir (28). Bakterideki SOS-aracılı mutasyon hızında artışın da metisilin HD'i gelişimi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Sefalosporin HD'li Enterobacterales izolatlarında artmış sefalotiaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Karbapenem HD'li enterik bakterilerde β -laktamaz genlerinin ekspresyonunda artış saptayan çalışmalar bulunurken, karbapenem HD'i saptanan non-fermentatif bakterilerde dışa atım pompalarının ekspresyonunda artış gösteren çalışmalar bulunmaktadır (29).

Glikopeptid Heterodirenci: Vankomisin-duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının heterojen vankomisin "intermediate" *S.aureus*'a (hVISA) dönüşümünde regülatör *agr* geninin mutasyonel disfonksiyonunun, *vraS* ve *walKR* iki-komponentli regülatör sistemlerin disfonksiyonunun, hücre duvar kalınlığında artışın ve hücre duvarının negatif yükündeki azalmanın etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tetrasiklin Heterodirenci: AcrAB dışa atım pompasının ekspresyonunda artış, S10 ribozomal proteini kodlayan *rpsJ* geninde insersiyon veya çerçeve kayması mutasyonları ile tigesiklinin 16S rRNA'ya afinitesinde azalma olması, tigesiklin heterodirencine yol açabilir (27).

Aminoglikozid Heterodirenci: Aminoglikozid modifiye edici enzimlerini (AME) ve aminoglikozidil asetil transferaz (*aac*) enzimini kodlayan genlerin kopya sayısında artış aminoglikozid heterodirencine sebep olabilir (30).

Kolistin Heterodirenci: Lipid A sentezinde rol alan *lpxA* ve *lpxC* genlerinin inaktivasyonu sonucu lipopolisakkarit sentezinde değişiklik meydana gelmesi ya da bazı bakteriler tarafından üretilen Ycel proteini ve putresin moleküllerinin varlığı kolistin heterodirencinden sorumlu olabilir. Ayrıca kolistin HD'li suşlarda lipid A modifiye eden enzimlerin ekspresyonunda artış olduğu ve *pmrD* geni kopya sayısında artış olduğu belirlenmiştir (27, 29).

Fosfomisin Heterodirenci: Hücre duvarında peptidoglikan sentez yolağındaki enzimlerden biri olan UDP-N-asetilglukozamin enolpirüviltransferaz (MurA1) enzim aktivitesindeki değişiklikler fosfomisin heterodirencine yol açabilmektedir (3).

Florokinolon Heterodirenci: Florokinolon heterodirenci sıklıkla *Mycobacterium tuberculosis* ve *Helicobacter pylori* bakterilerinde saptanmıştır. *GyrA* ve *gyrB* gen bölgelerinde direnç ile ilişkili 90., 91., 94.kodonlar haricindeki bölgelerde görülen insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonlarının florokinolon heterodirencine sebep olabileceği düşünülmektedir (31).

2.3.3. Heterodirencin Sınıflandırılması

Heterodirençli bakteriler; ya duyarlı bakteri popülasyonu ile dirençli alt popülasyonun klonal kökenlerine göre monoklonal ve poliklonal heterodirenç olarak ya da dirençli alt popülasyonda direnç durumunun stabilitesine göre stabil ve stabil olmayan heterodirenç olmak üzere sınıflandırılabilir.

Poliklonal HD: Uzun süre antibiyotik kullanımı durumunda, duyarlı bakteri popülasyonu içinde spontan mutasyonların birikmesi sonucunda duyarlı popülasyondan genetik olarak farklı dirençli alt popülasyonların oluşması, poliklonal heterodirence sebep olabilir. Birbirinden klonal olarak farklı, duyarlı ve dirençli bakterilerin aynı dokuda, eş zamanlı enfeksiyona yol açması da poliklonal heterodirencin olası sebeplerinden biridir. Özellikle *M.tuberculosis* ve *H.pylori* enfeksiyonlarında, hastada farklı klonal kökenlere sahip bakteri popülasyonlarının aynı anda enfeksiyon etkeni olması, poliklonal HD saptanmasına sebep olabilmektedir (4, 32).

Monoklonal HD: Monoklonal HD’de baskın olan duyarlı bakteri popülasyonu ile dirençli alt popülasyonu klonal olarak aynıdır. Genetik olmayan çeşitli direnç mekanizmaları sonucunda alt popülasyonda o antibiyotiğe karşı direnç gözlenir (4).

Stabil Heterodirenç: Antibiyotik içermeyen plaklara ardışık pasajlar sonucunda antibiyotik baskısının ortadan kalkmasıyla dirençli alt popülasyonda direnç durumunun devam etmesi, stabil HD olarak tanımlanmaktadır. Bakteri için düşük bedelli tekli nükleotid polimorfizmi (TNP), çerçeve kayması, insersiyon veya delesyon vb. mutasyonların stabil HD’ye yol açabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, porin ekspresyonunda azalma sonucunda bakteri membran permeabilitesinin azalmasının ya da dışa atım pompalarının ekspresyonunda artışın da stabil HD’ye sebep olabileceği bildirilmiştir (4, 26, 33).

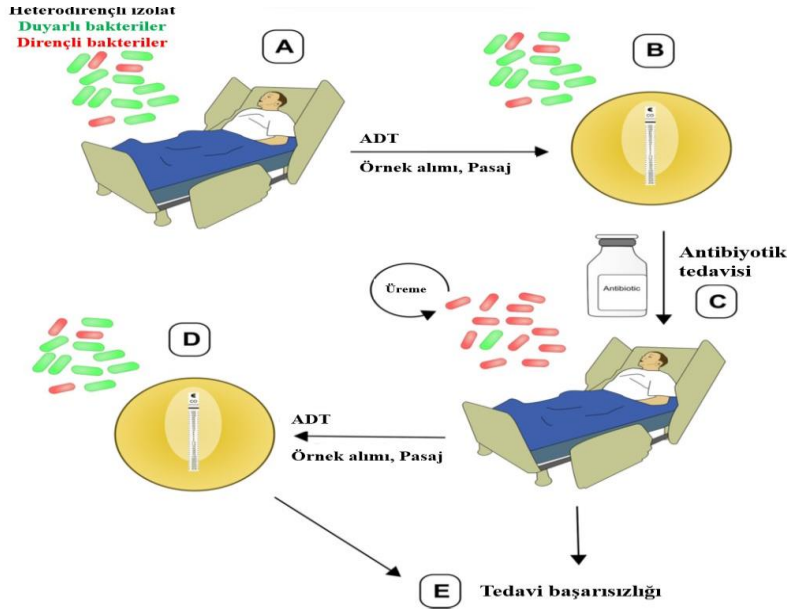
Stabil Olmayan Heterodirenç: Ardışık yerleşim gösteren gen amplifikasyonu ('Tandem gene amplification') sonucunda direnç genlerinin kopya sayısında artış, duyarlı bakteri popülasyonu içinde dirençli alt popülasyonların oluşumuna sebep olabilmektedir. Yapısal olarak kararsız ve bakteri için bedeli yüksek olan gen amplifikasyonlarının, antibiyotik baskısı ortadan kalktığına kaybolmasının, stabil olmayan HD'ye sebep olan ana mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bakteri için bedeli yüksek olan TNP, insersiyon veya delesyon gibi mutasyonların yükünü dengelemek için oluşan kompensatuvar mutasyonlar ile antibiyotik direncinin kaybı, stabil olmayan HD'nin diğer olası sebebidir (26, 33).

2.3.4. Heterodirencin Klinik Önemi

Duyarlı bakteri popülasyonu içinde dirençli alt popülasyon sıklığının düşük olması nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan SMD temelli antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) ile HD'li bakteriler saptanamamaktadır. HD'li bakterinin enfeksiyon etkeni olması durumunda, antibiyotik tedavisinin başlanması ile duyarlı bakteriler üzerine bakterisidal etki gözlenirken düşük sıklıkla bulunan dirençli alt popülasyonlar üzerine etki görülmemektedir. Bakterisidal etkinin görülmediği dirençli alt popülasyonlar, antibiyotik tedavisi altında üremeye devam ederek enfeksiyon bölgesinde baskın hale gelmekte ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda tedavi başarısızlığı ya da tekrarlayan enfeksiyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (34) (**Şekil 2.3**).

Heterodirenç ve sağkalım arasındaki ilişki sıklıkla hayvan enfeksiyon modellerinde araştırılmış olup, bu konuda yapılmış az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Kolistin HD'li enterik bakteriler ile enfekte edilen sıçan modellerinde kolistin tedavisi başarısızlıkla sonuçlanmıştır (35, 36). Karbapenem HD'li *P.aeruginosa* ile enfekte hastalarda hastanede kalış süresinin daha uzun olduğu ($P=0,009$) ve hastaların fonksiyonel kapasitesinde bozulmanın daha sık gözlemlendiği ($P=0,005$) bulunmuştur (37). Howard-Andersson ve arkadaşlarının yaptıkları bir klinik çalışmada, kolistin HD'li *P.aeruginosa* suşları ile enfekte hastalarda hastanede yatış süresindeki uzama istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, HD ve 90-günlük sağkalım arasında bir ilişki saptanamamıştır (38). Günümüzde birçok bakteri türünde, son seçenek antibiyotikler dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı yüksek oranda

saptanan heterodirencin, antimikrobiyal direnç gelişiminde bir ara evre olabileceği, heterodirencin çoklu ilaç direnci ve tüm ilaçlara karşı direnç durumuyla sonuçlanabileceği düşünülmektedir (33).



Şekil 2.3. Heterodirencin enfeksiyonun gidişatı ve antibiyotik duyarlılık testleri üzerine etkileri (34)

2.3.5. Heterodirencin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Duyarlı bakteri popülasyonu içinde dirençli alt popülasyon sıklığının düşük olması nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) ile HD'li bakteriler genellikle saptanamamaktadır. SMD testinde kullanılan bakteri inokulumunun yaklaşık olarak 10^5 kob/mL olması nedeniyle düşük sıklıkta görülen dirençli alt popülasyonlar tespit edilememektedir.

Literatürde ne üzerinde karar birliğine varılmış bir HD tanımı, ne de HD tespitinde kullanılacak standardize bir yöntem bulunmaması sebebiyle yapılan çalışmalarda HD'li izolatların saptanması amacıyla farklı yöntemler ve farklı HD tanımları kullanılmıştır. PAP yöntemi, HD tespitinde altın standart yöntem olarak kabul edilmiş olmasına rağmen uygulaması zor, maliyeti yüksek ve zaman alıcı bir yöntem olması sebebiyle rutin hizmet veren laboratuvarlarda kullanılması uygun değildir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla uygulanmakta olan disk difüzyon ve antibiyotik gradiyent testinde, disk ve antibiyotik gradiyent şeridi

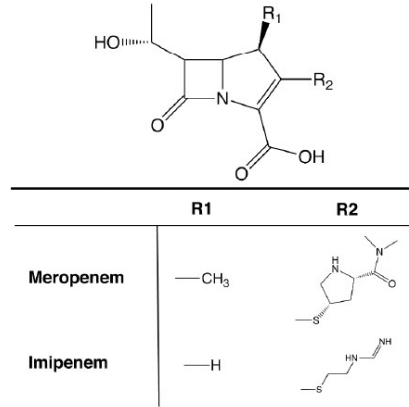
etrafında oluşan inhibisyon zonu içinde üreyen kolonilerin görülmesi durumunda HD'den şüphelenilmelidir. Bu testler ile HD'li olabileceği belirlenen suşlarda HD varlığının, altın standart PAP testi ile doğrulanması önerilmektedir (4). Bugüne kadar yapılmış çeşitli çalışmalarda HD saptanması açısından agar bazlı antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçlar ile PAP testi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve birbirinden çok farklı sonuçlar elde edilmiştir (3, 39).

2.4. Karbapenem Sınıfı Antibiyotikler

2.4.1. Karbapenem Sınıfı Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler

Karbapenem sınıfı antibiyotikler, *Streptomyces cattleya*'nın ürettiği tienamisin maddesinin semi-sentetik türevleridir. Bu grupta yer alan antibiyotikler, penisilinlere benzer şekilde altı üyeli bir β -laktam halkasına ve beş üyeli bir tiyazolidin halkasına sahiptir. Penisilinlerden farklı olarak karbapenem molekülünün β -laktam halkasının 1.pozisyonunda sülfür yerine karbon atomu bulunur, tiyazolidin halkasının 2. ve 3.pozisyonlardaki karbon atomları arasında çift bağ mevcuttur. Ayrıca β -laktam grubu diğer antibiyotiklerden farklı olarak karbapenemlerin tiyazolidin halkasının 6.pozisyonunda *trans*-1 α -hidroksietil grubu bulunması, karbapenemlerin çoğu β -laktamaz enzimi tarafından parçalanmasını önlemektedir. Karbapenemler özgün moleküler özellikleri sayesinde hem anaerop ve aerop, hem de gram-pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine bakterisidal etkili, son seçenek tedavide kullanılan antibiyotiklerden biridir. Çoğu karbapenem, oral biyoyararlanımları düşük olmasından dolayı parenteral yolla uygulanır. Dokulara dağılımı iyi olan karbapenemler, böbrek ve karaciğerde metabolize edilirler (6).

Bakteri hücre duvarında bulunan porinler aracılığıyla gram-negatif bakterilerin dış hücre membranından geçip periplazmik aralığa ulaşan karbapenemler, hücre duvar sentezinde karboksipeptidasyon ve transpeptidasyon basamaklarında yer alan PBP'leri inhibe ederek bakterisidal etki gösterir. Karbapenemler; yüksek molekül ağırlıklı PBP'lere (PBP1a, 1b, 2 ve 4) yüksek afinite ile, düşük molekül ağırlıklı PBP3, PBP7 ve PBP8'e ise daha düşük afinite ile bağlanırlar (20).



Şekil 2.4. Karbapenemlerin molekül yapıları

2.4.2. Karbapenem Sınıfına Dahil Antibiyotikler

İmipenem (İMP)

Tienamisinin kararsız molekül yapısı sebebiyle klinik kullanımda etkili olmamasından dolayı N-formimidoil yan zinciri eklenmiş tienamisin (imipenem) geliştirilmiştir. İmipenem, insan böbrek proksimal tübül epitelinin fırçalı kenarında sentezlenen dihidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimi tarafından böbreklerde metabolize edilir. İlacın bu enzim ile inaktive olmasını önlemek için imipenem, DHP-1 inhibitörü olan silastatin ile kombine kullanılır. Meropenemden farklı olarak heterosiklik yan zincire sahip değildir (Şekil 2.4), PBP-2, PBP-1a, PBP-1b'ye yüksek afinite ile ve PBP-3'e ise düşük afinite ile bağlanır (6, 20, 40).

Meropenem (MEM)

Meropenem molekülünün 1.pozisyonunda 1β-metil grubu bulunması, meropenemi DHP-1 enzimine dirençli hale getirdiği için silastatin ile kombine kullanılmasına gerek yoktur. Molekülün 2.pozisyonunda bulunan pirilidonil grubu, meropenemin gram-negatif bakteriler üzerine etkinliğinin imipenemden daha geniş olmasını sağlamaktadır (Şekil 2.4). Meropenem PBP-2 ve PBP-3'e çok yüksek afinite ile, PBP-1a ve PBP-1b'ye yüksek afinite ile bağlanır (6, 20, 40).

Ertapenem

Molekül yapısı meropeneme benzeyen ertapenem molekülünün 2.pozisyonunda meta-benzoik asit grubu bulunmaktadır. Bu büyük yan zincir sebebiyle ertapenemin diğer karbapenemlere göre daha yüksek molekül ağırlığına ve anyonik değeriğe sahip

olması, *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. üzerine etkisinin yok denecek kadar az olmasına sebep olmaktadır. *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Pasteurella* gibi zor üreyen gram-negatif bakterilere karşı diğer karbapenemlerden 5-10 kat daha fazla etkilidir. Negatif yüklü meta-benzen halkasına sahip olması nedeniyle molekülün yarılanma ömrü diğer karbapenemlerden daha uzundur (6, 20, 40).

Diğer Karbapenem Sınıfı Antimikrobiyal Ajanlar

Doripenem molekülünün 2.pozisyonda sülfamoilaminoetil-pirolidintiyo grubu bulunması nedeniyle doripenem non-fermentatif bakteriler üzerine diğer karbapenemlere kıyasla daha yüksek etkiye sahiptir. Doripenem *P.aeruginosa*'da PBP-3'e, *S.aureus*'ta PBP-1, PBP-2, PBP-4'e ve *Escherichia coli*'de PBP-2'ye yüksek afinite ile bağlanır.

Panipenem, renal tübül epiteli tarafından inaktive olmasını engellemek ve renal toksisiteyi azaltmak için betamipron ile kombine kullanılır. Tebipenem pivoksil, DHP-1 ile inaktivasyona dirençli, oral yolla kullanılan, ön-ilaç formunda bir karbapenemdir. İnaktif formdaki ilaç bağırsaklarda esteraz enzimi ile aktif forma dönüşür. *Streptococcus pneumoniae*'nin PBP'lerine karşı afinitesi yüksektir. Biapenem Japonya'da kullanımda olan, anaerop etkinliği yüksek bir karbapenem üyesidir. Foripenem, bisiklik çekirdek yapısında olan, çekirdeklerinde karbon atomu bulunmayan, oral yolla kullanılan penem türevi bir antibiyotiktir.

2.5. Karbapenem Direnci

2.5.1. Karbapenem Direnci Hakkında Genel Bilgiler

Karbapenem dahil olmak üzere çok ilaca dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* prevalansının giderek artması sebebiyle Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) 2017 yılında karbapenem-dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*'yı acil önlem alınması gereken mikroorganizmalar arasında ilan etmiştir. Karbapenem-dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, hastanede yatış sürelerinin uzamasına, mortalite oranlarının ve sağlık harcamalarının artmasına sebep olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyallerin sınırlı olması,

tedavide ağır yan etki oluşturma potansiyeline sahip kolistin kombinasyonlarının kullanımını zorunlu hale getirmiştir (38, 41).

Karbapenemlere karşı intrinsik (doğal) veya kazanılmış direnç görülebilmektedir.

2.5.2. İntrinsik (Doğal) Karbapenem Direnci

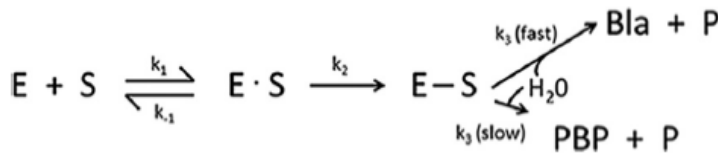
Stenotrophomonas maltophilia ve *Burkholderia cepacia* türleri kromozomal metallo- β -laktamaz enzimine sahip olmalarından dolayı karbapenemlere karşı intrinsik dirençlidir. Yüksek molekül ağırlığına sahip ertapenem, *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. türlerine karşı etkisizdir. *M.tuberculosis*, *Mycobacterium avium* ve *Enterococcus faecium* türleri de karbapenemlere karşı intrinsik dirençlidir.

2.5.3. Kazanılmış Karbapenem Direnci

i. Enzimatik Mekanizmalar

Karbapenem sınıfı antibiyotikler karbapenem hidroliz aktivitesine sahip β -laktamaz enzimleri tarafından hidroliz edilebilir. β -laktamaz enzimleri; β -laktam grubu antibiyotiklerin β -laktam halkasının farklı tepkimeler ile açılmasını sağlayarak bu antibiyotikleri inaktive edebilir. β -laktamaz enzimleri, β -laktam halkalarını ya aktif bölgesinde serin aminoasidi bulunan bir serin proteaz enzimi kolaylaştırıcılığında açılma enzimi kompleksi oluşması yoluyla ya da aktif bölgesinde çinko atomu bulunan bir metallo- β -laktamaz kolaylaştırıcılığında hidroliz tepkimesi gerçekleşmesi yoluyla açabilmektedir. Bakteriler bu enzimleri kodlayan genleri, mobil genetik elemanların bakteriler arasında transferi sayesinde kazanmaktadır (42, 43, 44).

Serin proteaz yapısındaki β -laktamaz enzimleri, β -laktam antibiyotiğin yapısındaki amid bağı iki basamaklı bir tepkime ile hidroliz ederek β -laktam halkasının açılmasını sağlamaktadır (**Şekil 2.5**). Birinci basamakta; β -laktam grubu antibiyotik, yapısındaki anyonik karboksilat grubu ve β -laktamaz enziminin katyonik grupları etkileşerek, enzimin aktif bölgesine çekilir. β -laktamaz aktivasyonu için uygun pozisyona gelen β -laktam antibiyotik, enzim tarafından asetile edilir. Enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasidi, asetilasyon tepkimesinde görev alır. İkinci basamakta ise; katalitik su molekülü Glu166 ile aktive olarak β -laktam molekülünü deasetile eder (45).



Şekil 2.5. β -laktam substratı ve β -laktamaz enzimi ile gerçekleşen iki basamaklı tepkime (42)

Beta-laktamaz enzimlerinin sınıflandırmasında; substrat profillerinin benzerliği dikkate alınarak, Bush-Medeiros-Jacoby sınıflandırma sistemi ve aminoasit dizilimlerinin benzerliği dikkate alınarak, Ambler sınıflandırma sistemi olmak üzere, iki farklı sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır.

Ambler sınıflandırma sistemi β -laktamazları aminoasit dizilimlerinin benzerliğine göre dört gruba ayırmaktadır (44). Ambler grup A, C ve D beta-laktamazlar, aktif bölgesinde serin bulunan proteaz süperailesine dahildir. Ambler grup B metallo- β -laktamazlar, kataliz için çinko veya başka bir ağır metallere gereksinim gösteren enzimlerdir.

Ambler Grup A (Bush-Jacoby grup 2f) serin karbapenemazlar: Bu sınıfa dahil β -laktamaz enzimleri, moleküllerinin 70. pozisyonundaki aktif bölgede serin amino asiti bulunduran proteaz enzimleridir. Bu grubun temsilcileri olan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemase (KPC), *Guiana extended-spectrum β -lactamase* (GES), *Serratia marcescens* enzyime (SME), *nonmetallo enzyime carbapenemase class A* (nmcA), *imipenem-hydrolyzing* (IMI) enzimleri, karbapenemler dahil tüm β -laktam sınıfı antibiyotikleri hidrolize edebilir. KPC ve GES (GES-1 hariç) enzimleri, kromozomal olarak kodlanan diğer grup A enzimlerden farklı olarak, plazmidde yerleşim gösterir (42, 44, 46).

Ambler Grup B (Bush-Jacoby grup 3) β -laktamazlar: Ambler grup B β -laktamaz enzimleri; grup A, C ve D serin β -laktamazlardan farklı olarak, katalizör olarak çinko (Zn^{+2}) veya diğer divalen ağır metallere ihtiyaç duyan metallo- β -laktamaz (MBL) enzimleridir. Bu enzimler etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi divalen katyonlarla şelat oluşturan moleküller ile inhibe olurlar (46, 47, 48).

Bu gruba dahil enzimler; yapılarındaki aminoasitlerin ve ağır metal iyonlarının moleküldeki yerleşimine göre (Ambler sistemi) B1, B2 ve B3; substrat benzerliklerine göre (Bush-Jacoby-Medeiros sistemi) 3a, 3b ve 3c olarak sınıflandırılırlar (**Tablo 2.1**). Ambler sistemine göre; sınıf B1 enzimler, aktif çinko bağlanma bölgesinde üç adet histidin aminoasidine sahiptir. Sınıf B2 enzimlerde çinko bağlayan motifin 1.pozisyonunda, B1 enzimlerinden farklı olarak histidin yerine asparajin aminoasiti bulunmaktadır (48, 49). Bush-Jacoby-Medeiros sistemine göre; grup 3a MBL enzimleri karbapenemler dahil tüm β -laktamları (monobaktamlar hariç), grup 3b karbapenemleri, grup 3c sefalosporinleri yüksek afinite ile hidroliz etmektedir.

Tablo 2.1. Metallo- β -laktamaz enzimleri hakkında bilgiler (47, 49)

Bush-Jacoby-Medeiros grubu	Alt grup	Hedef Substrat	Enzimler
3a	B1	Geniş spektrum β -laktam hidrolizi	IMP, VIM, GIM, SPM
3b	B2	Güçlü karbapenem hidrolizi	CphA, <i>sfh</i>
3c	B3	Güçlü sefalosporin hidrolizi	FEZ-1, GOB-1-7

CphA: Carbapenem hydrolyzing *Aeromonas hydrophila*, FEZ: *Fluoribacter gormanii* endogenous zinc β -lactamase, GIM: German imipenemase, GOB: *Chryseobacterium meningosepticum* class B, IMP: Imipenemase, *sfh*: *Serratia fonticola* carbapenem hydrolase, VIM: Verona integron encoded metallo- β -lactamaz

Ambler Grup D β -laktamazlar: Oksasilini hidrolize eden OXA türü β -laktamazlar *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* türleri ve *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır. OXA türü enzimlerin aminoasit dizilimleri birbirleri arasında oldukça farklılık göstermektedir. Enzimde 70.-73. pozisyonlarda bulunan S-T-F-K tetrad yapısı, enzimin katalitik aktivitesinden sorumludur. Grup D enzimlerin klavulanik asit tarafından inhibisyonu zayıftır. Bu enzimleri kodlayan genler sıklıkla mobil genetik elemanlar üzerinde bulunmaları nedeniyle, bakteriler arasında yayılımları kolaydır. Bu enzimlerin mobil genetik elemanlarla bakteriler tarafından kolaylıkla kazanılabilmesi, oksasilinazları önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Karbapenemaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen oksasilinaz enzimlerinin sayısının gün geçtikçe artması, bu enzimlerin önemini arttırmaktadır (45, 50).

OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58, OXA-143 enzimleri; *A.baumannii*'de geniş bir dağılıma sahip olmaları nedeniyle klinik açıdan büyük öneme sahiptir. OXA-48 enzimi sıklıkla Enterobacterales türlerinde tanımlanmış olmakla birlikte non-fermentatif bakterilerde de bulunabilmektedir.

Karbapenemaz aktivitesine sahip olmadığı düşünülen çeşitli oksasilinazların (örn. OXA-2, OXA-10) da karbapenemaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (51, 52).

ii. Enzimatik Olmayan Mekanizmalar

Karbapenem grubu antibiyotikleri hidroliz aktivitesine sahip β -laktamaz enzimlerin varlığı dışında, spontan mutasyon sonucu porin kaybı veya dışa atım pompalarının ekspresyonunda artış gibi mekanizmalar da karbapenem direncine yol açabilir (11, 12, 53).

Porin kaybı: Gram-negatif bakterilerde antibiyotiklerin bakteri hücrelerinin içine girebilmesi için hücre membranını aşması gerekmektedir. Kromozomal genlerde meydana gelen spontan mutasyonlar sonucunda porin ekspresyonunun azalması imipenem direncine yol açabilmektedir.

Dışa atım pompalarının üretiminde artış: Bakteride görülen spontan mutasyonlar sonucunda "*Resistance-nodulation-cell division*" (RND) süperailisine ait dışa atım pompa sistemlerinin ekspresyonunda artış, karbapenem direncine yol açan mekanizmalardan biridir. *A.baumannii* izolatlarında AdeABC, AdeFGH, AdeIJK; *P.aeruginosa* izolatlarında MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ dışa atım pompaları tanımlanmıştır. MexA-MexB-OprM dışa atım pompalarının artmış ekspresyonunun, bakteride meropenem ve doripenem direnci gelişmesine sebep olabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatlar

Ocak 2014-Temmuz 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan ve kateter kültürü örneklerinden izole edilen 256 adet *A.baumannii* ve 152 adet *P.aeruginosa* suşu olmak üzere, toplam 408 adet non-fermenratif bakteri çalışmaya dahil edilmiştir. Her hastaya ait sadece bir kan izolatu çalışmaya alınmıştır. Suşlar çalışma süresince %15 gliserollü beyin kalp infüzyon besiyeri içerisinde -20⁰C'de saklanmıştır.

3.2. İzolatların İmipenem ve Meropenem Duyarlılığının Belirlenmesi

Tüm izolatların imipenem ve meropenem duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon (SMD) testi ile belirlenmiştir. SMD testi ile imipenem veya meropenem duyarlı bulunan izolatlar disk difüzyon testi ve antibiyotik gradiyent testi uygulanmıştır.

3.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

SMD testinde kullanılmak amacıyla, istenilen konsantrasyonlarda antibiyotik stok çözeltileri hazırlamak için kullanılması gereken antibiyotik tozu ağırlıkları ve çözücü hacimleri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir. Antibiyotiklerin potens değerleri üretici firma tarafından belirtildiği şekilde kabul edilmiştir. İmipenem tozunu çözmek için fosfat tamponlu salin, meropenem tozunu çözmek için ise distile su kullanılmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Antibiyotik potensi (}\mu\text{g/mg)}}{\text{İstenilen yoğunluk (}\mu\text{g/mL)}}$$

Konsantrasyonları 5120 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde hazırlanan imipenem ve meropenem stok çözeltileri, katyonlu Mueller-Hinton sıvı besiyeri ile iki kat dilüsyonlarda seyreltilerek 64 ile 0,03 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında olacak şekilde antibiyotik çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltiler 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklara dağıtılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen suşlar kanlı agarda $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İzolatların taze kültürlerinden, steril U tabanlı cam tüpler içerisinde salin ile 0,5 McFarland standardına eş değer bulanıklıkta bakteri inokülumları hazırlanmıştır. Bakteri inokülumlarından 50 μL alınarak, 4950 μL katyonlu Mueller-Hinton sıvı besiyeri içeren tüplere aktarım yapılarak 1/100 oranında seyreltme gerçekleştirilmiştir. Mikrodilüsyon plaklarının her kuyucuğuna, hazırlanan 10^6 kob/mL konsantrasyona sahip bakteri çözeltilerinden 50 μL inoküle edilmiştir. Son seyreltme işlemi sonunda kuyucuklarda inokulum yoğunlukları 5×10^5 kob/mL olmuştur. İnokulum işleminden sonra mikrop plaklar $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *S.aureus* ATCC 29212 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29213 suşları kullanılmıştır.

İnkübasyonun ardından mikrodilüsyon plağındaki kuyucuklarda gözle görülebilir üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu, izolatın minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, $\mu\text{g/mL}$) değeri olarak kabul edilmiştir. Saptanan MİK değerleri CLSI (2021, 31.Baskı) ve EUCAST (v11.0, 2021) duyarlılık sınır değer tablolarına göre kategorik olarak yorumlanmıştır (54, 55) (**Tablo 3.1**).

Tablo 3.1. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatları için **A.** EUCAST kılavuzunda ve **B.** CLSI kılavuzunda yer alan imipenem ve meropenem minimum inhibitör konsantrasyon duyarlılık sınır değerleri

A.

EUCAST Duyarlılık Sınır Değerleri (v11.0, 2021)			
	Duyarlı	Artmış dozda duyarlı	Dirençli
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>A.baumannii</i>			
İmipenem	≤2	4	>4
Meropenem	≤2	4-8	>8
<i>P.aeruginosa</i>			
İmipenem	≤0,001	0,002-4	>4
Meropenem	≤2	4-8	>8

B.

CLSI Duyarlılık Sınır Değerleri (2021, 31.Baskı)			
	Duyarlı	“Intermediate”	Dirençli
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>A.baumannii</i>			
İmipenem	≤2	4	≥8
Meropenem	≤2	4	≥8
<i>P.aeruginosa</i>			
İmipenem	≤2	4	≥8
Meropenem	≤2	4	≥8

3.2.2. Disk Difüzyon Testi ve Antibiyotik Gradyent Testi

Çalışmamızda; SMD testi ile imipenem veya meropenem duyarlı olduğu saptanan izolatlara, esas olarak HD yönünden zon içi üreme varlığının araştırılması amacıyla, disk difüzyon ve gradiyent test yöntemleri uygulanmıştır. Bununla birlikte;

SMD testi ile elde edilen MİK değerlerinin, difüzyon temelli testler ile elde edilen sonuçlarla uyumu da karşılaştırılmıştır.

Taze üremiş bakteri kültürleri kullanılarak steril U tabanlı cam tüpler içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri çözeltileri, Mueller-Hinton agar besiyerleri (Oxoid, İngiltere) üzerine steril bir eküvyon yardımı ile yayılmıştır. 10 µg imipenem ve meropenem içeren antibiyotik diskleri (BBL-Becton Dickinson, ABD) ve antibiyotik gradiyent test şeritleri (bioMérieux, Fransa) besiyerlerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. Disk ve gradiyent test şeritleri yerleştirildikten sonra plaklar etüvde $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Antibiyotik disklerinin etrafında bakteri üremesinin inhibe olduğu zon çapı cetvelle milimetre biriminde (mm) ölçülmüş; antibiyotik gradiyent test şeritlerinin etrafında oluşan elips şeklinde üremenin inhibe olduğu alanın gradiyent test şeridi ile kesiştiği bölgedeki sayısal değer, MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Saptanan MİK değerleri ve ölçülen zon çapları, EUCAST ve CLSI duyarlılık sınır değerlerine göre yorumlanmıştır (**Tablo 3.1 ve 3.2**).

Tablo 3.2. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatları için **A.** EUCAST kılavuzunda ve **B.** CLSI kılavuzunda yer alan imipenem ve meropenem inhibisyon zon çapı sınır değerleri (mm)

A.

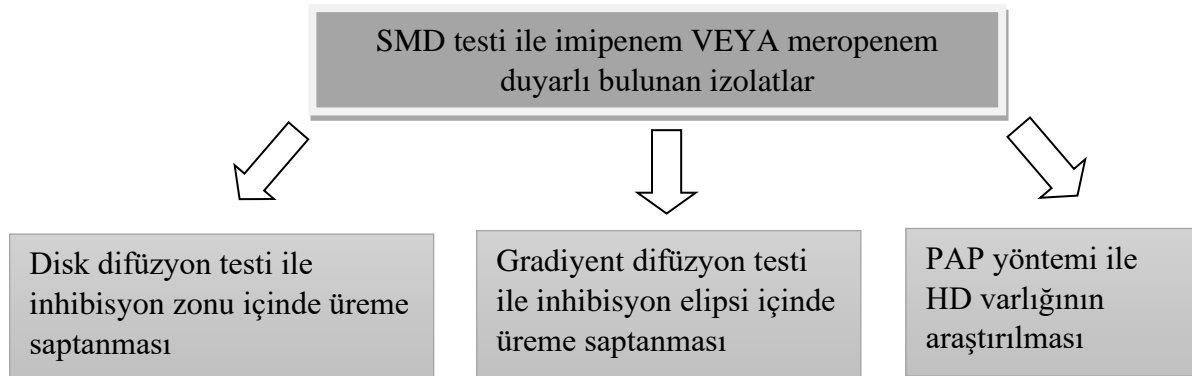
EUCAST Duyarlılık Sınır Değerleri (v11.0, 2021)				
	Disk içeriği (µg)	Duyarlı \geq	Artmış Dozda Duyarlı	Dirençli <
<i>A.baumannii</i>				
İmipenem	10	24	21-23	21
Meropenem	10	21	15-20	15
<i>P.aeruginosa</i>				
İmipenem	10	50	20-49	20
Meropenem	10	24	18-23	18

B.

CLSI Duyarlılık Sınır Değerleri (2021, 31.Baskı)				
	Disk içeriği (µg)	Duyarlı \geq	“Intermediate”	Dirençli \leq
<i>A.baumannii</i>				
İmipenem	10	22	19-21	18
Meropenem	10	18	15-17	14
<i>P.aeruginosa</i>				
İmipenem	10	19	16-18	15
Meropenem	10	19	16-18	15

3.3. Karbapenem Heterodirenci Varlığının Araştırılmasında Uygulanan Fenotipik Yöntemler

SMD testi ile imipenem veya meropenem duyarlı olduğu saptanan izolatlarda imipenem ve meropenem HD varlığı, antibiyotik diski ve gradiyent test şeridi etrafında oluşan inhibisyon zonu içinde üremenin tespit edilmesi ve PAP testi uygulanarak araştırılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Karbapenem HD varlığının araştırılmasında uygulanan akış şeması

3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon testinin uygulaması, önceki bölümde (3.2.2.Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Testleri) anlatılmıştır. $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 18-24 saat inkübasyondan

sonra antibiyotik disklerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonu içinde üreme gözlenen suşlar, heterodirençli (HD'li) olarak kabul edilmiştir.

3.3.2. Antibiyotik Gradyent Test Yöntemi

Antibiyotik gradiyent testinin uygulanışı, önceki bölümde (**3.2.2.Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Testleri**) anlatılmıştır. İnokülasyon işleminin ardından plaklar etüvde $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, gradiyent test şeritlerinin etrafında üremenin inhibe olduğu elips şeklindeki inhibisyon zonu içinde üreme gözlenen suşlar, HD'li olarak kabul edilmiştir.

3.3.3. Popülasyon Analiz Profili Yöntemi

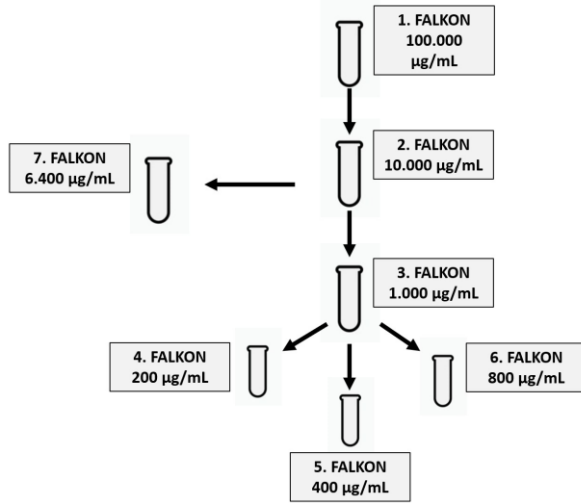
PAP Testinde Kullanılan Plakların Hazırlanması

SMD testi ile karbapenem-duyarlı olduğu belirlenen tüm izolatlara, HD tespitinde altın standart yöntem olarak kabul edilen popülasyon analizi profili (PAP) yöntemi uygulanmıştır.

Farklı imipenem ve meropenem konsantrasyonlarına sahip PAP plakları hazırlamak için ihtiyaç duyduğumuz çözücü hacmi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. İmipenem ve meropenem antibiyotik tozları, belirlenen miktarda çözücü hacimleri içinde çözülerek, 100,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlu antibiyotik çözeltileri elde edilmiştir. İmipenem tozunu çözmek için fosfat tamponlu salin, meropenem tozunu çözmek için distile su kullanılmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Antibiyotik potensi } (\mu\text{g}/\text{mg})}{\text{İstenilen yoğunluk } (\mu\text{g}/\text{mL})}$$

100.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlu imipenem ve meropenem çözeltileri katyonlu Mueller-Hinton sıvı besiyeri ile seyreltilerek; 10,000, 6,400, 1,000, 800, 400 ve 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlu imipenem ve meropenem çözeltileri elde edilmiştir (**Şekil 3.2**).

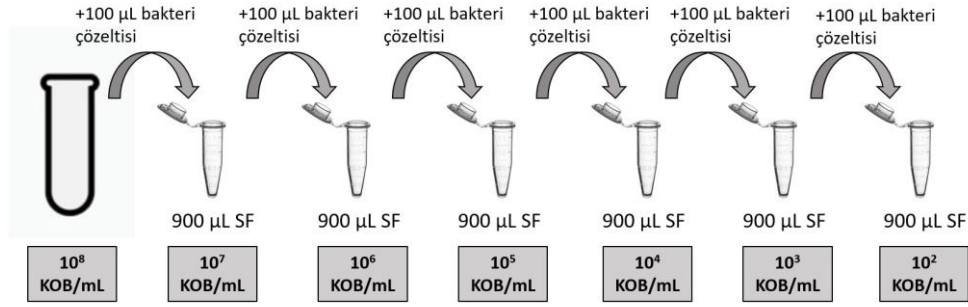


Şekil 3.2. PAP testinde kullanılan, farklı konsantrasyonlara sahip antibiyotik çözeltilerinin hazırlanmasında izlenen akış şeması

Her iki antibiyotik için sekizer adet balon joje içine gerekli miktarda Mueller-Hinton agar besiyeri tozu ve distile su konularak otoklavda sterilize edilmiştir. 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/mL konsantrasyonlarında imipenem ve meropenem içeren PAP plaklarını hazırlamak için besiyeri içine eklenmesi gereken antibiyotik çözeltilerinin miktarları, “ $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ ” formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra Mueller-Hinton agar süspansiyonları su banyosunda bekletilerek 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra içine 6,400, 800, 400 ve 200 µg/mL konsantrasyonlu antibiyotik çözeltilerinden hesaplanan miktarlarda eklenmiş ve hemen ardından steril petri kaplarının içine dağıtılmıştır. Bu işlem sonunda 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/mL konsantrasyonlarında imipenem ve meropenem içeren PAP plakları elde edilmiştir. Hazırlanan plaklar 24 saat içinde kullanılmıştır.

PAP Testinin Uygulanması

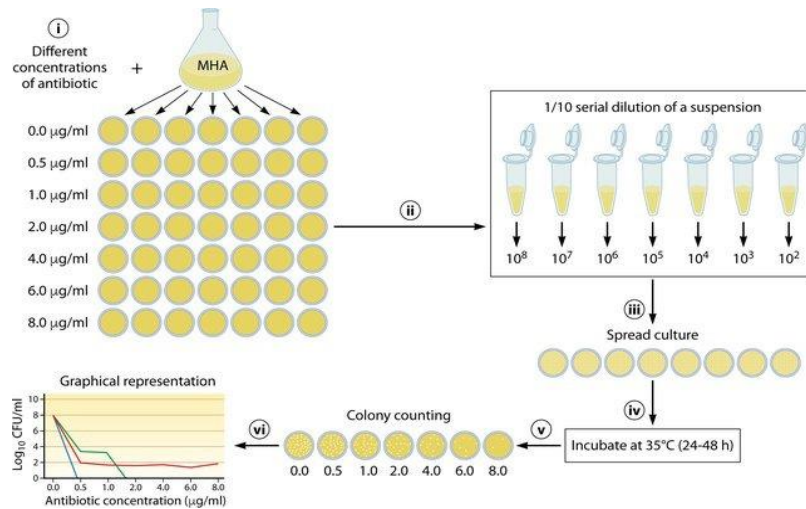
Her bir suşun 0,5 McFarland (10^8 kob/mL) standardına eş değer bulanıklığa sahip bakteri çözeltileri, U tabanlı steril cam tüpler içinde salin kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri çözeltilerini seyreltmek amacıyla, her suş için yedişer adet mikrosantrifüj tüpü içine 900’er µL salin konulmuştur. 10^8 kob/mL bakteri yoğunluğuna sahip bakteri süspansiyonlarından 100 µL alınarak, ilk mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu seyreltme işlemi, her mikrosantrifüj tüpü için aynı hacimlerde tekrarlanmıştır. Aktarma işlemlerinin sonunda 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 kob/mL yoğunluğuna sahip bakteri çözeltileri elde edilmiştir (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3. Farklı yoğunluklarda bakteri çözeltilerinin hazırlanma şeması

Hazırlanan farklı yoğunluklardaki bakteri çözeltilerinden 100'er µL alınarak, 0,5-32 µg/mL konsantrasyonda imipenem ve meropenem içeren PAP plaklarının ve antibiyotik içermeyen Mueller-Hinton agar plaklarının yüzeyine inoküle edilmiştir (Şekil 3.4). PAP plakları 35±2°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiş, plaklarda 24. ve 48. saatlerde üreyen koloni sayıları kaydedilmiştir. Antibiyotik içermeyen Mueller-Hinton agar plakları 35±2°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiş, 24. saatte antibiyotik içermeyen Mueller-Hinton agar plaklarında üreyen koloni sayıları kaydedilmiştir. Karbapenem-duyarlı tüm izolatlarda karbapenem heterodirenci varlığı, PAP testi en az iki kez çalışılarak araştırılmıştır.

PAP testinde kalite kontrol suşları olarak *E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 29212 ve *E.faecalis* ATCC 29213 kullanılmıştır.

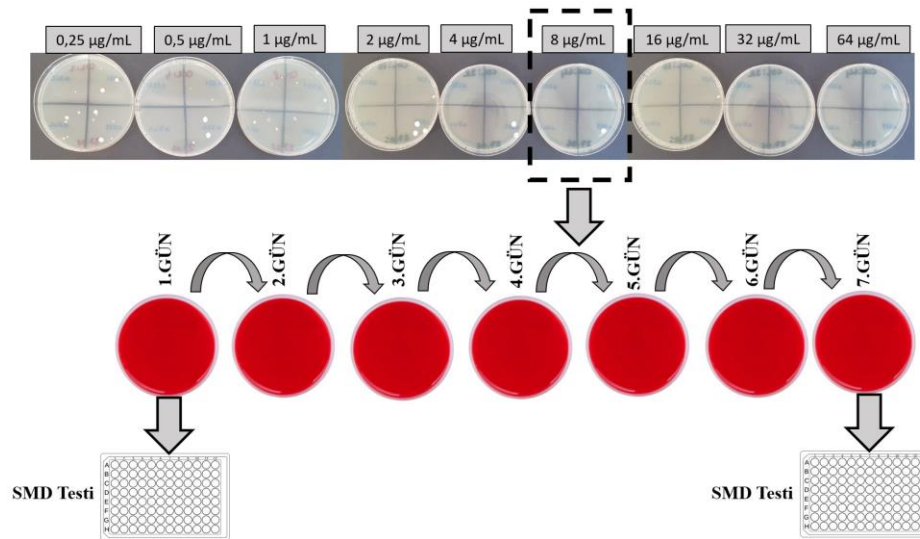


Şekil 3.4. PAP testinin uygulanmasında izlenen akış şeması

Çalışmamızda; üremenin hiç inhibe olmadığı ve üremenin tamamen inhibe olduğu PAP plaklarının antibiyotik konsantrasyonları arasında ≥ 8 kat fark olması ve dirençli alt popülasyon sıklığının 1×10^{-7} 'den daha yüksek olması halinde, test edilen suş “heterodirençli” kabul edilmiştir (3, 36). Hem imipenem hem meropenem karşı heterodirençli saptanan izolatlar ise “ko-heterodirençli” olarak adlandırılmıştır.

3.4. Heterodirenç Stabilitesinin Belirlenmesi

HD’li suşlarda üremenin gözlemlendiği en yüksek konsantrasyonda antibiyotik içeren PAP plağından kanlı agara pasaj yapılmış ve yedi gün boyunca her gün pasaj tekrarlanmıştır. Daha sonra hem birinci gün hem de yedinci gün pasajlarına SMD testi uygulanmıştır. Yedinci günde yapılan SMD testi ile karbapenem duyarlı olmadığı belirlenen HD’li izolatlar, “**stabil heterodirençli**”; yedinci günde yapılan SMD testi ile karbapenem-duyarlı olduğu belirlenen HD’li izolatlar, “**stabil olmayan heterodirençli**” olarak kabul edilmiştir (4).



Şekil 3.5. Heterodirenç stabilitesinin araştırılmasında izlenen akış şeması

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenemaz Genlerin Tespiti

Karbapenem duyarlı, heterodirençli ve duyarlı olmayan suşlarda karbapenemaz genlerinin varlığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır.

3.5.1. PZR Yöntemi Uygulanan İzolatlar

Çalışmamızda karbapenem duyarlı, heterodirençli, “intermediate” ve dirençli *A.baumannii* izolatlarında; *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}* ve *bla_{OXA-58}* genleri, *P.aeruginosa* izolatlarında ise *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-2}* ve *bla_{OXA-10}* genleri araştırılmıştır (Tablo 3.1).

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız ATCC kalite kontrol suşları ve bakteri izolatları, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nun ve Dr. Patrice Nordmann’ın laboratuvarlarından sağlanmıştır. Her bir PZR çalışmamızda, araştırılan genleri bulundurduğu bilinen suşlar “pozitif kontrol” olarak kullanılmıştır.

3.5.2. EDTA, TE ve TBE Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

0,5 M etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi hazırlamak için, 186 g EDTA tozu, 1 L distile suyun içinde NaOH ilave edilerek çözülmüştür. 1 M Tris-HCl çözeltisi elde etmek için 121 g Tris-HCl tozu, 1 litre distile su içinde çözülmüştür.

Bir litre Tris-EDTA (TE) çözeltisi hazırlamak için; hazırlanmış 1 M Tris çözeltisinden 10 mL ve 0,5 M EDTA çözeltisinden 1,3 mL alınarak 990 mL distile su ile karıştırılmıştır. 1 L Tris-borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi hazırlamak için 40 mL 0,5 M EDTA çözeltisi, 108 g Tris-HCl ve 55 g borik asit tozu ile karıştırılmış, elde edilen süspansiyon distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan x10 derişimli TE ve TBE çözeltileri kullanılacağı zaman x1 derişimli seyreltik halde kullanılmıştır.

3.5.3. Bakteriyel DNA’nın İzolasyonu

DNA izolasyonu gerçekleştirmek amacıyla 24 saatlik taze bakteri kültüründen alınan 2-3 koloni steril öze ile alınarak 750 µL TE çözeltisi içeren steril mikrosantrifüj tüpleri içine konulmuştur. Mikrosantrifüj tüpü içindeki bakteri-TE çözeltileri 15 saniye boyunca vorteks cihazı ile karıştırılmasının ardından 90°C’ye ayarlanmış ısı bloğuna yerleştirilerek 10 dakika inkübe edilmiştir. Isıtma işleminden sonra 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüpün içindeki çözeltinin 50 µL’lik süpernatant kısmı otomatik pipet ile alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (56).

3.5.4. Kullanılan Primer Dizileri ve Primer Çözeltilerinin Hazırlanması

Liyofilize haldeki primerler, DNaz içermeyen steril su ile seyreltilerek 100 pmol/ μ L konsantrasyonda olacak şekilde primer çözeltileri hazırlanmıştır. Konsantrasyonu 100 pmol/ μ L olan primer çözeltilerinden 10'er μ L alınarak, 90 μ L DNaz içermeyen steril su ile karıştırılmış ve bu işlem sonunda 10 pmol/ μ L konsantrasyonunda primer çözeltileri elde edilmiştir. PZR tepkimelerinde 10 pmol/ μ L konsantrasyona ayarlanmış primer çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan primer çözeltileri -20°C'de saklanmıştır.

3.5.5. PZR Karışımlarının Hazırlanması

Çalışmamızda PZR karışımları hazırlanırken iki farklı firmanın kullanıma hazır PZR miksleri (Qiagen Taq PCR Master Mix, Almanya ve Genemark PCR Master Mix, Tayvan) kullanılmıştır. İlk markanın ürünü kullanılırken; PZR karışımına 12,5 μ L TopTaq polimeraz, 2,5 μ L 10xCoral load DNA boyası, her biri 10 pmol/ μ L'lik primer süspansiyonlarından 0,4'er μ L ve 2,5 μ L kalıp DNA konulmuştur, toplam hacim 25 μ L olacak şekilde kalan hacim nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. İkinci markanın ürünü kullanılırken; PZR karışımına 5 μ L Taq polimeraz, her biri 10 pmol/ μ L'lik primer süspansiyonundan 0,4'er μ L ve 2,5 μ L kalıp DNA konulmuştur, toplam hacim 25 μ L olacak şekilde kalan hacim nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Her bir PZR karışımı hazırlandığında, tepkimedeki primerlere özgü pozitif kontrol suşlarına ait kalıp DNA'lar 'pozitif kontrol' olarak kullanılmıştır.

3.5.6. Gen Bölgelerinin Amplifikasyonunda Uygulanan PZR Koşulları

Çalışmamızda dört farklı multipleks PZR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle ait PZR koşulları **Tablo 3.4**'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Gen	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>bla_{KPC}</i>	798	(57)
KPC-R	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG			
GES-F	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	<i>bla_{GES}</i>	399	(58)
GES-R	TTTGTCCGTGCTCAGGAT			
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC	<i>bla_{IMP}</i>	232	(57)
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla_{NDM}</i>	621	(57)
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla_{OXA-48}</i>	438	(57)
OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
OXA-23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	<i>bla_{OXA-23}</i>	501	(59)
OXA-23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT			
OXA-24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla_{OXA-24}</i>	246	(59)
OXA-24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
OXA-51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	<i>bla_{OXA-51}</i>	353	(59)
OXA-51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			
OXA-58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla_{OXA-58}</i>	599	(59)
OXA-58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
OXA-2-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla_{OXA-2}</i>	478	(60)
OXA-2-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
OXA-10-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	<i>bla_{OXA-10}</i>	720	(60)
OXA-10-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			

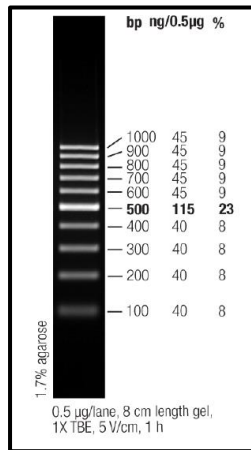
A: Adenin, C: Sitozin, F: Sense, G: Guanin, R: Anti-sense, T: Timin, Y: Sitozin veya guanin

3.5.7. Agaroz Jel Elektroforez ile PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulanması ile elde edilen PZR ürünleri, agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak görüntülenmiştir. Çalışmamızda %1,5 oranında agaroz içerecek şekilde, agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için; 120 mL TBE çözeltisi içinde 1,8 mg agaroz tozu (Sigma Aldrich, ABD) çözülmüştür. Agarozun çözünmesi ve homojen jel yapısının sağlanabilmesi için, TBE-agaroz tozu çözeltisi mikrodalga fırında 4-5 dakika kaynatılmıştır. Nükleik asitlerin floresan ışık ile görünür hale gelmesi için, mikrodalga fırından çıkarılan sıvı haldeki agaroz jel çözeltisi hafifçe soğutulmuş ve içine etidyum bromür eklenmiştir. Sıvı agaroz jel çözeltisi katılaşmadan, içine taraklar yerleştirilmiş yatay jel elektroforez tablasının içine yavaşça ve kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Agaroz jelin katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Tabla içindeki

agaroz jel katılaştığında, jelin içine gömülü haldeki taraklar çıkarılmış, agaroz jel tabla ile beraber PZR tankının içine yerleştirilmiş ve PZR tankının içine agaroz jelin üstünü kapatacak kadar TBE çözeltisi doldurulmuştur. PZR tepkimesi sonucu elde edilen PZR ürünlerinden ve DNA moleküler ağırlık belirtecinden 5'er µL alınarak katı agaroz jel içindeki kuyucuklara otomatik pipet ile aktarılmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra PZR tankının kapağı kapatılmış ve PZR tankı güç kaynağına bağlanmıştır. Güç kaynağı ile 45-50 dakika boyunca PZR tankına 100 Volt elektrik akımı uygulanmış, böylece elektroliz işlemiyle negatif yüklü PZR ürünlerinin katottan anota doğru hareket etmesi sağlanmıştır.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra agaroz jel, PZR tankının içinden çıkarılarak morötesi trans-illüminatör cihazına yerleştirilmiş ve amplifiye olmuş PZR ürünlerinin varlığı değerlendirilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin oluşturduğu bantların moleküler ağırlıkları, DNA moleküler ağırlık belirteciye göre saptanmıştır. PZR ürünlerinin ampikon büyüklüklerinin değerlendirilmesinde DNA moleküler ağırlık belirteci olarak 100 baz çiftlik belirteç (Thermo Fisher Scientific, ABD) firma önerileri doğrultusunda hazırlanarak kullanılmıştır (**Şekil 3.6**).



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan DNA moleküler ağırlık belirteci

3.6. İstatistiksel Analiz

A.baumannii ve *P.aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropenem MİK değerlerinde yıllara göre istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı, Kruskal-Wallis testi ile araştırılmıştır.

Tablo 3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

Kaynak	PZR Amplifikasyon Basamakları	Sıcaklık, Süre	Döngü Sayısı
<i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{KPC}, <i>bla</i>_{NDM}, <i>bla</i>_{OXA-48} multipleks çalışması			
(57)	İlk denatürasyon basamağı	94°C, 10 dakika	x36 Döngü
	Denatürasyon basamağı	94°C, 30 saniye	
	Bağlanma basamağı	52°C, 40 saniye	
	Elongasyon basamağı	72°C, 50 saniye	
	Final uzama basamağı	72°C, 5 dakika	
<i>bla</i>_{OXA-2}, <i>bla</i>_{OXA-10} multipleks çalışması			
(61)	İlk denatürasyon basamağı	95°C, 10 dakika	x35 Döngü
	Denatürasyon basamağı	95°C, 1 dakika	
	Bağlanma basamağı	57°C, 1 dakika	
	Elongasyon basamağı	72°C, 1,5 dakika	
	Final uzama basamağı	72°C, 3 dakika	
<i>bla</i>_{GES} monopleks çalışması			
(58)	İlk denatürasyon basamağı	94°C, 10 dakika	x30 Döngü
	Denatürasyon basamağı	94°C, 40 saniye	
	Bağlanma basamağı	60°C, 40 saniye	
	Elongasyon basamağı	72°C, 1 dakika	
	Final uzama basamağı	72°C, 7 dakika	
<i>bla</i>_{OXA-23}, <i>bla</i>_{OXA-24}, <i>bla</i>_{OXA-51}, <i>bla</i>_{OXA-58} multipleks çalışması			
(59)	İlk denatürasyon basamağı	94°C, 5 dakika	x30 Döngü
	Denatürasyon basamağı	94°C, 25 saniye	
	Bağlanma basamağı	52°C, 40 saniye	
	Elongasyon basamağı	72°C, 50 saniye	
	Final uzama basamağı	72°C, 6 dakika	

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Kliniklere ve Yıllara Göre Dağılımları

Ocak 2014-Temmuz 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen periferik kan ve kateter kültürü örneklerinden izole edilen 256 *A.baumannii* ve 152 *P.aeruginosa* izolatu (toplam 408 izolat) çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatların 112'si (%27,5) 2014 yılında, 76'sı (%18,6) 2015 yılında, 111'i (%27,2) 2016 yılında 62'si (%15,2) 2017 yılında, 47'si (%11,5) 2018 yılında izole edilmiştir (**Tablo 4.1**).

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen bakterilerin izole edildikleri yıllara ve kliniklere göre dağılımı

Klinikler	2014		2015		2016		2017		2018		Toplam	
	Ab	Pa	Ab	Pa	Ab	Pa	Ab	Pa	Ab	Pa	Ab	Pa
YBÜ	41	6	23	5	32	6	15	3	13	-	124	20
Çocuk Hastalıkları	2	5	1	3	-	2	3	1	-	2	6	13
İç Hastalıkları	8	1	8	2	6	3	4	2	1	2	27	10
Diğer dahili klinikler	7	10	6	7	12	12	5	11	9	5	39	45
Onkoloji ve Hematoloji	12	11	6	4	8	9	3	1	-	7	29	32
Genel Cerrahi	3	3	6	2	8	4	8	6	2	3	27	18
Diğer cerrahi klinikler	1	2	1	2	2	7	-	-	-	3	4	14
Toplam	74	38	51	25	68	43	38	24	25	22	256	152

Ab: *A.baumannii*, Pa: *P.aeruginosa*, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi (Erişkin, çocuk, yenidoğan ve anestezi yoğun bakım üniteleri dahil edilmiştir.)

*Genel cerrahi kliniklerine genel cerrahi servisi ve yanık ünitesi dahildir.

Çalışmaya dahil edilen izolatların %35,3'ü (s=144) YBÜ'lerinden, %64,7'si (s=264) ise diğer kliniklerden gönderilen kan kültürlerinden izole edilmiştir. Suşların %4,7'si (s=19)'u çocuk hastalardan, %95,3'ü (s=389) ise erişkin hastalardan elde edilmiştir.

4.2. İmipenem ve Meropenem Duyarlılık Sonuçları

4.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları

A.baumannii izolatları hem CLSI hem EUCAST duyarlılık sınır değerlerine göre değerlendirildiğinde; 256 *A. baumannii* izolatının %11,3'ü (s=29) imipenem-duyarlı, %0,4'ü (s=1) imipenem “intermediate” (CLSI) veya artmış dozda duyarlı (EUCAST), %88,3'ü (s=226) imipenem-dirençli; %11,7'si (s=30) meropenem-duyarlı, %0,8'i (s=2) meropenem “intermediate” (CLSI) veya artmış dozda duyarlı (EUCAST), %87,5'i (s=224) meropenem-dirençli olarak saptanmıştır.

P.aeruginosa izolatlarına ait SMD sonuçları, CLSI duyarlılık sınır değerlerine göre incelendiğinde; 152 izolatın imipenem için %37,5'i (s=57) duyarlı, %19,1'i (s=29) “intermediate” ve %43,4'ü (s=66) dirençli bulunurken; meropenem için %38,2'si (s=58) duyarlı, %15,1'i (s=23) “intermediate” ve %46,7'si (s=71) dirençli olarak tespit edilmiştir. EUCAST duyarlılık sınır değerlerine göre incelendiğinde ise 152 izolatın imipenem için; %56,6'sı (s=86) artmış dozda duyarlı, %43,4'ü (s=66) dirençli iken; meropenem için %38,2'si (s=58) duyarlı, %21,7'si (s=33) artmış dozda duyarlı ve %40,1'i (s=61) dirençli olarak saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen izolatların CLSI sınır değerlerine göre imipenem ve meropenem antibiyotiklerine karşı duyarlılık sonuçlarının yıllara göre dağılımı **Tablo 4.2**'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmaya dahil edilen bakterilerin izole edildikleri yıllara göre ve CLSI duyarlılık kategorilerine göre dağılımı **A. A.baumannii** **B. P.aeruginosa**

A.

Yıllar	İmipenem (Sayı)			Meropenem (Sayı)		
	S	I	R	S	I	R
2014	5	0	69	5	0	69
2015	6	0	45	6	0	45
2016	6	0	62	7	1	60
2017	10	1	27	10	1	27
2018	2	0	23	2	0	23
Toplam	29	1	226	30	2	224

S: Duyarlı, I: “Intermediate”, R: Dirençli

B.

Yıllar	İmipenem (Sayı)			Meropenem (Sayı)		
	S	I	R	S	I	R
2014	15	5	18	15	6	17
2015	8	9	8	11	3	11
2016	15	8	20	15	7	21
2017	9	2	13	7	3	14
2018	10	5	7	10	4	8
Toplam	57	29	66	58	23	71

S: Duyarlı, I: “Intermediate”, R: Dirençli

Çalışmaya dahil edilen izolatların SMD testi ile belirlenen imipenem ve meropenem MİK dağılımları **Tablo 4.3**'te; MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları **Tablo 4.4**'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Sıvı mikrodilüsyon testi ile belirlenen karbapenem MİK değerlerinin dağılımı

Antibiyotik Konsantrasyonu (µg/mL)												
	≤0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
<i>A.baumannii</i>												
İMP	2	1	0	6	12	4	4	1	2	1	12	211
s, %	0,8	0,4		2,3	4,6	1,6	1,6	0,4	0,8	0,4	4,7	82,4
MEM	4	0	4	12	4	3	3	2	0	5	44	175
s, %	1,6		1,6	4,6	1,6	1,2	1,2	0,8		2	17,1	68,3
<i>P.aeruginosa</i>												
İMP	0	0	1	1	4	23	28	29	7	16	6	37
s, %			0,7	0,7	2,7	15,1	18,4	19,1	4,6	10,5	3,9	24,3
MEM	0	0	0	6	10	21	21	23	10	13	12	36
s, %				3,9	6,6	13,8	13,8	15,1	6,6	8,6	7,9	23,7

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, s: Sayı, %: Yüzde

Tablo 4.4. İzolatların sıvı mikrodilüsyon testi ile belirlenen imipenem ve meropenem MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları

	MİK ₅₀ (µg/mL)	MİK ₉₀ (µg/mL)	MİK Aralığı (µg/mL)
<i>A.baumannii</i>			
İMP	>64	>64	≤0,03 - >64
MEM	>64	>64	≤0,03 - >64
<i>P.aeruginosa</i>			
İMP	4	64	≤0,03 - >64
MEM	4	64	≤0,03 - >64

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/mL)

Çalışmamızda; 2015 yılında *A.baumannii* suşlarının İMP MİK değerlerinin, 2014 ve 2018 yıllarına göre daha geniş bir aralıkta değişim gösterdiği saptanmıştır ($p=0,033$, $p=0,016$). *A.baumannii* suşlarının MEM MİK değerlerinde, *P.aeruginosa* suşlarının İMP MİK değerlerinde ve *P.aeruginosa* suşlarının MEM MİK değerlerinde, yıllar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,283$, $p=0,687$, $p=0,416$).

4.2.2. Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Test Sonuçları

Sıvı mikrodilüsyon testi ile karbapenem-duyarlı olduğu saptanan izolatlara, HD varlığını araştırmak amacıyla, disk difüzyon ve antibiyotik gradiyent testi uygulanmıştır. İzolatların disk difüzyon testi ile elde edilen zon çapları ve antibiyotik gradiyent testi ile belirlenen MİK değerlerinin, SMD testi ile uyumu sırasıyla **Tablo 4.7**'de ve **Tablo 4.8**'de sunulmuştur.

A.baumannii izolatlarına ait DD sonuçları değerlendirildiğinde, hem CLSI hem de EUCAST duyarlılık sınır değerlerine göre; SMD testi ile İMP-duyarlı saptanan 29 izolatın 2'si DD ile dirençli saptanırken MEM-duyarlı olan 30 *A.baumannii* izolatın beşi ($s=5$) DD testi ile meropenem-dirençli bulunmuştur (**Tablo 4.5-A**). Antibiyotik gradiyent testi ile SMD test sonuçları kıyaslandığında ise SMD testi ile karbapenem-duyarlı saptanan tüm *A.baumannii* izolatlarının antibiyotik gradiyent testi ile de duyarlı olduğu bulunmuştur (**Tablo 4.5-B**).

Tablo 4.5. CLSI kılavuzuna göre karbapenem-duyarlı *A.baumannii* izolatlarının difüzyon testleri sonuçları ile sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları arasındaki uyum **A.** DD testi sonuçları **B.** Antibiyotik gradiyent testi sonuçları

A.

SMD	Disk Difüzyon Testi			
	CLSI		EUCAST	
	Duyarlı	Duyarlı olmayan	Duyarlı	Duyarlı olmayan
İMP-duyarlı <i>A.baumannii</i> (s=29)	27	2	27	2
MEM-duyarlı <i>A.baumannii</i> (s=30)	25	5	25	5

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, s: Sayı

B.

SMD	Antibiyotik Gradiyent Testi			
	CLSI		EUCAST	
	Duyarlı	Duyarlı olmayan	Duyarlı	Duyarlı olmayan
İMP-duyarlı <i>A.baumannii</i> (s=29)	29	0	29	0
MEM-duyarlı <i>A.baumannii</i> (s=30)	30	0	30	0

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, s: Sayı

P.aeruginosa izolatlarına ait sonuçlar değerlendirildiğinde ise CLSI sınır değerlerine göre SMD testi ile İMP-duyarlı bulunan 57 izolatın tümü hem DD hem de gradiyent test ile İMP-duyarlı olarak saptanmıştır. EUCAST sınır değerlerine göre ise hem DD hem de gradiyent test ile hiçbir izolat duyarlı kategorisinde yer almamıştır. SMD testi ile MEM-duyarlı bulunan 58 izolatın tümü, iki kılavuza (CLSI ve EUCAST) göre de hem DD hem de gradiyent test ile MEM-duyarlı bulunmuştur (**Tablo 4.6**).

Tablo 4.6. CLSI kılavuzuna göre karbapenem-duyarlı *P.aeruginosa* izolatlarının difüzyon testlerinin sonuçları ile sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları arasındaki uyum

SMD	Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Testi			
	CLSI		EUCAST	
	Duyarlı	Duyarlı olmayan	Duyarlı	Duyarlı olmayan
İMP-Duyarlı <i>P.aeruginosa</i> (s=57)	57	0	0	57
MEM-Duyarlı <i>P.aeruginosa</i> (s=58)	58	0	58	0

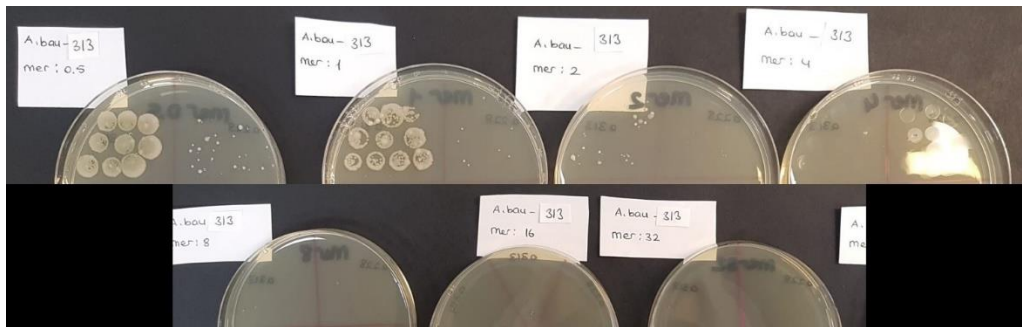
İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, s: Sayı

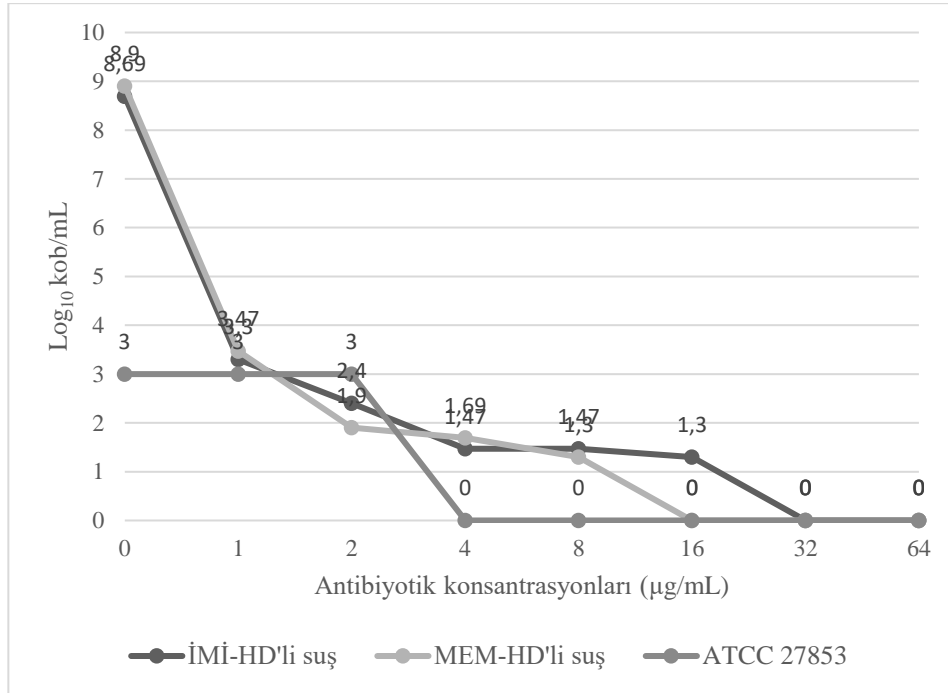
4.3. Popülasyon Analiz Profili Sonuçları

A.baumannii İzolatlarına Ait Popülasyon Analiz Profili Sonuçları

Çalışmamızda; İMP-duyarlı 29 *A.baumannii* izolatının yedisi (%24,1) İMP-HD'li, MEM-duyarlı 30 *A.baumannii* izolatın dokuzu (%30) MEM-HD'li saptanmıştır. *A.baumannii* izolatlarının dördü hem imipeneme hem de meropeneme HD'li olarak saptandığı için ko-heterodirençli olarak kabul edilmiştir. İmipenem ve meropenem PAP plaklarında üreyen HD'li *A.baumannii* izolatlarına ait görüntüler ve HD'li suşlarına ait popülasyon analizleri Şekil 4.1'de; karbapenem HD'li *A.baumannii* izolatlarına ait veriler Tablo 4.7'de sunulmuştur.

A.



B.

Şekil 4.1. Heterodirençli *A.baumannii* izolatlarına ait; **A.** Meropenem PAP plağında görülen üreme paterni **B.** Meropenem HD'li ve imipenem HD'li suş ile *P.aeruginosa* ATCC 27853 kalite kontrol suşuna ait popülasyon analizi grafiği

Tablo 4.7. Karbapenem heterodirençli *A.baumannii* izolatlarına ait PAP ve SMD testleri ile elde edilen sonuçlar **A.** İmipenem, **B.** Meropenem

A.

Suş No.	Natif pl. İMP MİK	HD alt pl. sıklığı (kob/mL)	PAP plaklarında üreme gözlenen maks. antibiyotik []	İMP MİK	
				1.gün	7.gün
A48	1	$2,85 \times 10^{-7}$	16	32	32
A123	0,25	2×10^{-6}	8	16	16
A210	1	$2,85 \times 10^{-7}$	4	4	0,5
A249	0,25	$6,3 \times 10^{-7}$	16	32	32
A259	0,25	2×10^{-7}	4	4	0,125
A314	0,25	$1,8 \times 10^{-7}$	8	8	8
A326	0,125	$6,3 \times 10^{-7}$	32	4	4

İMP: İmipenem, Maks.: Maksimum, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/mL), kob/mL: Koloni oluşturan birim/mL, []: konsantrasyon µg/mL, pl.: Popülasyon

B.

Suş No.	Natif pl. MEM MİK	HD alt pl. sıklığı (kob/mL)	PAP plaklarında üreme gözlenen maks. antibiyotik []	MEM MİK	
				1.gün	7.gün
A16	0,5	$1,1 \times 10^{-7}$	8	8	1
A48	1	$1,4 \times 10^{-6}$	8	8	2
A85	0,125	$1,2 \times 10^{-7}$	8	8	4
A167	0,25	$1,1 \times 10^{-7}$	4	4	0,125
A210	1	$2,3 \times 10^{-7}$	16	32	32
A249	0,25	$6,3 \times 10^{-6}$	16	32	64
A313	1	$2,7 \times 10^{-7}$	16	32	32
A314	0,25	$1,1 \times 10^{-7}$	16	16	16
A326	0,125	$1,3 \times 10^{-7}$	4	8	16

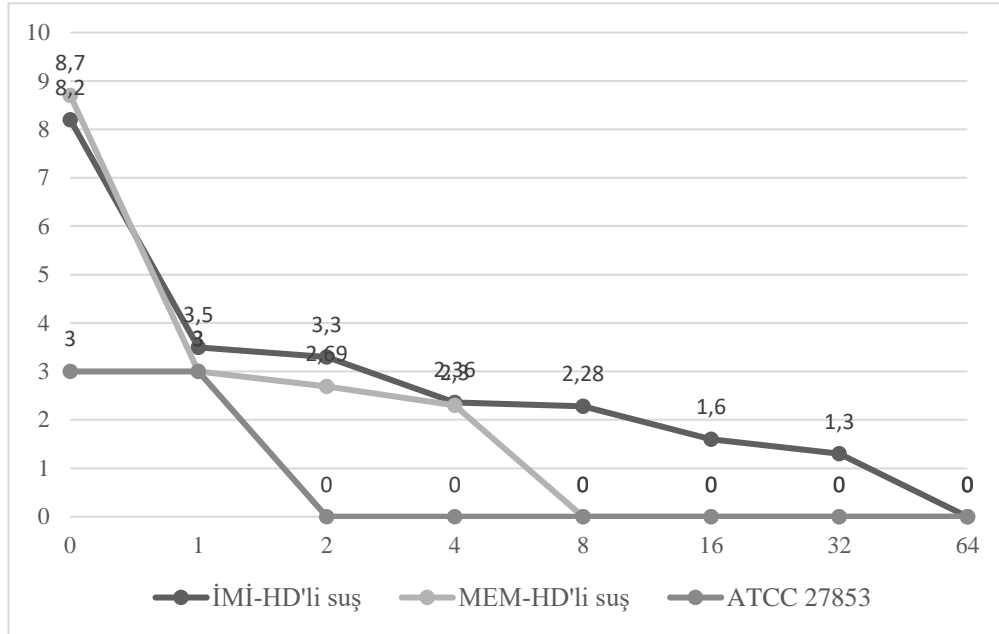
Maks.: Maksimum, MEM: Meropenem, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$), kob/mL: Koloni oluşturan birim/mL, []: konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$, pl.: Popülasyon

***P.aeruginosa* İzolatlarına Ait Popülasyon Analiz Profili Sonuçları**

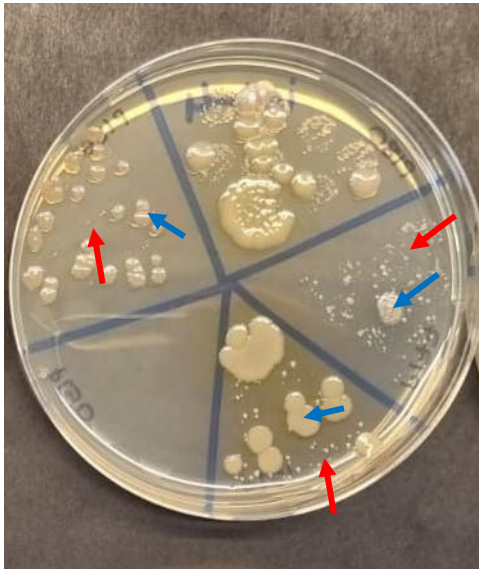
Çalışmamıza dahil edilen İMP-duyarlı 57 *P.aeruginosa* izolatının 33'ü (%57,9) İMP-HD'li, MEM-duyarlı 58 izolatın ise sekizi (%13,8) MEM-HD'li bulunmuştur. *P.aeruginosa* izolatlarının yedisinin ko-heterodirençli olduğu belirlenmiştir.

İmipenem ve meropenem PAP plaklarında HD'li *P.aeruginosa* izolatlarına ait popülasyon analizi sonuçları Şekil 4.2-A'da; karbapenem HD'li *P.aeruginosa* izolatlarına ait veriler Tablo 4.8'de sunulmuştur. Bazı *P.aeruginosa* izolatlarında (İMP-HD, s=5; MEM-HD, s=1) yüksek antibiyotik konsantrasyonu içeren PAP plaklarında büyük ve küçük koloniler olmak üzere iki farklı üreme paterni olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2-B). Bu izolatlarda büyük ve küçük koloniler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

A.



B.



Şekil 4.2. A. İmipenem HD'li ve meropenem HD'li *P.aeruginosa* izolatları ile *P.aeruginosa* ATCC 27853 kalite kontrol suşuna ait popülasyon analizi grafiği **B.** PAP plaklarında büyük (B) ve küçük (K) koloniler olmak üzere iki farklı üreme paterni gösteren *P.aeruginosa* izolatları (Büyük koloniler mavi ok ile, küçük koloniler kırmızı ok ile gösterilmiştir.)

Tablo 4.8. Karbapenem heterodirençli *P.aeruginosa* izolatlarına ait PAP ve SMD testleri ile elde edilen sonuçlar **A.** İmipenem, **B.** Meropenem

A.

Suş No.	Natif pl. İMP MİK	HD alt pl. sıklığı (kob/mL)	PAP plaklarında üreme gözlenen maks. antibiyotik []	Koloni morfolojisi	İMP MİK	
					1.gün	7.gün
P2	1	$1,4 \times 10^{-7}$	16	ÖY	16	16
P13	1	$1,1 \times 10^{-6}$	4	ÖY	8	8
P20	2	$1,2 \times 10^{-6}$	4	ÖY	4	4
P25	2	$1,2 \times 10^{-7}$	8	ÖY	16	1
P37	1	$1,5 \times 10^{-7}$	32	ÖY	32	1
P43	1	$1,9 \times 10^{-7}$	8	ÖY	8	8
P46	1	$3,3 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	4
P53	1	$1,1 \times 10^{-7}$	8	ÖY	16	16
P64	2	$5,7 \times 10^{-7}$	16	B	32	32
				K	4	2
P65	2	1×10^{-7}	8	ÖY	32	16
P69	0,5	$1,6 \times 10^{-7}$	8	ÖY	8	0,25
P70	1	$3,1 \times 10^{-7}$	16	ÖY	16	1
P76	2	$1,1 \times 10^{-6}$	32	ÖY	32	1
P79	2	$3,5 \times 10^{-7}$	4	B	8	8
				K	2	1
P90	1	$1,3 \times 10^{-7}$	32	ÖY	16	16
P96	1	$2,7 \times 10^{-7}$	8	ÖY	16	16
P107	2	$5,7 \times 10^{-7}$	8	ÖY	8	8
P108	1	8×10^{-7}	16	ÖY	8	8
P109	2	$2,6 \times 10^{-7}$	8	ÖY	8	8
P114	2	8×10^{-7}	16	ÖY	32	32
P130	1	$1,8 \times 10^{-7}$	8	B	16	16
		$3,3 \times 10^{-7}$	4	K	2	2
P162	1	$1,6 \times 10^{-7}$	32	ÖY	32	32

Tablo 4.8. A. Devam

Suş No.	Natif pl. İMP MİK	HD alt pl. sıklığı (kob/mL)	PAP plaklarında üreme gözlenen maks. antibiyotik []	Koloni morfolojisi	İMP MİK	
					1.gün	7.gün
P165	2	1,3x10 ⁻⁶	8	ÖY	32	32
P175	1	4x10 ⁻⁷	8	ÖY	8	8
P177	1	2x10 ⁻⁷	4	B	8	8
				K	2	1
P180	2	2,5x10 ⁻⁷	8	ÖY	16	16
P191	2	8,8x10 ⁻⁷	4	B	8	8
				K	1	1
P193	1	5x10 ⁻⁶	8	ÖY	8	8
P197	1	6,7x10 ⁻⁷	8	ÖY	8	8
P210	0,5	2x10 ⁻⁷	8	ÖY	8	0,5
P214	2	1,3x10 ⁻⁷	8	ÖY	8	1
P227	1	2,4x10 ⁻⁶	8	ÖY	8	8
P231	1	7,4x10 ⁻⁷	8	ÖY	8	16

İMP: İmipenem, Maks.: Maksimum, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/mL), kob/mL: Koloni oluşturan birim/mL, []: konsantrasyon µg/mL, pl.: Popülasyon

B.

Suş No.	Natif pl. MEM MİK	HD alt pl. sıklığı (kob/mL)	PAP plaklarında üreme gözlenen maks. antibiyotik[]	Koloni morfolojisi	MEM MİK	
					1.gün	7.gün
P25	2	5×10^{-7}	2	ÖY	4	4
P79	2	$1,5 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	8
P108	1	$1,2 \times 10^{-7}$	4	B	4	4
				K	0,25	0,25
P130	2	$2,9 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	2
P175	0,5	$7,5 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	4
P193	2	$1,8 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	2
P209	1	$1,7 \times 10^{-7}$	4	ÖY	4	1
P214	0,5	2×10^{-7}	4	ÖY	2	1

Maks.: Maksimum, MEM: Meropenem, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$), kob/mL: Koloni oluşturan birim/mL, []: konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$, pl.: Popülasyon

4.4. Heterodirençli İzolatların Saptanmasında, Disk Difüzyon ve Antibiyotik Gradyent Testi Sonuçlarının, PAP Testi Sonuçları ile Karşılaştırılması

A.baumannii izolatları değerlendirildiğinde PAP testi ile İMP-HD'li saptanan yedi izolattan altısında antibiyotik diski ve/veya antibiyotik gradiyent test şeridi etrafında oluşan inhibisyon zonu içinde üreme saptanırken; MEM-HD'li saptanan dokuz izolattan altısında üreme tespit edilmiştir .

P.aeruginosa izolatları değerlendirildiğinde ise, PAP testi ile İMP-HD'li saptanan 33 izolattan 13'ünde inhibisyon zonu içinde üreme saptanırken; MEM-HD'li saptanan sekiz izolattan üçünde zon içi üreme tespit edilmiştir.

A.baumannii ve *P.aeruginosa* izolatlarında PAP testi ile difüzyon temelli test (disk difüzyon ve/veya antibiyotik gradient test) verilerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri **Tablo 4.9**'da verilmiştir.

Tablo 4.9. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatlarında PAP testi ile difüzyon temelli test (disk difüzyon ve/veya antibiyotik gradiyent test) verilerinin karşılaştırılması

	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
<i>A.baumannii</i>				
İMP zon içi üreme	85,7	60	42,9	92,3
MEM zon içi üreme	66,7	71,4	50	83,3
<i>P.aeruginosa</i>				
İMP zon içi üreme	39,4	54,5	56,5	37,5
MEM zon içi üreme	37,5	42,9	9,7	80,8

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, PPD: pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer, %: Yüzde

4.5. Heterodirenç Stabilitesi Sonuçları

Çalışmamızda stabil İMP-HD ve MEM-HD oranları *A.baumannii* suşlarında sırasıyla %71,4 ve %66,7 olarak saptanırken; *P.aeruginosa* izolatlarında sırasıyla %78,8 ve %50 olarak tespit edilmiştir. Karbapenem-duyarlı olan *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında stabil-HD saptanan, stabil-olmayan HD saptanan ve HD saptanmayan izolatların dağılımı **Tablo 4.10**'da sunulmuştur.

Yüksek antibiyotik konsantrasyonu içeren PAP plaklarında büyük ve küçük koloniler olmak üzere iki farklı üreme paterni gösteren *P.aeruginosa* suşları için heterodirenç stabilite tespiti amacıyla birinci ve yedinci günlerde yapılan karbapenem SMD testi sonucunda; büyük kolonilerin karbapenem-dirençli, küçük kolonilerin karbapenem-duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Karbapenem-duyarlı izolatların HD varlığına göre gruplandırılması

	Duyarlı, HD Saptanmayan s (%)	Duyarlı, HD Saptanan		Toplam s (%)
		Stabil s (%)	Stabil olmayan s (%)	
<i>A.baumannii</i>				
İMP	22 (75,9)	5 (17,2)	2 (6,9)	29 (100)
MEM	21 (70)	6 (20)	3 (10)	30 (100)
<i>P.aeruginosa</i>				
İMP	24 (42,1)	26 (45,6)	7 (12,3)	57 (100)
MEM	50 (86,2)	4 (6,9)	4 (6,9)	58 (100)

HD: Heterodirenç, İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, s: Sayı, %: Yüzde

4.6. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

CLSI duyarlılık sınır değerlerine göre, karbapenem-dirençli 226 *A.baumannii* ve karbapenem-dirençli 71 *P.aeruginosa* izolatında karbapenemaz genlerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarında en sık *bla_{OXA-51}* (%100) ve *bla_{OXA-23}* (%86,3) karbapenemaz genleri saptanmıştır. Bu iki enzim dışında saptanan diğer direnç genlerinin (*bla_{NDM}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-24}*) görülme sıklığı oldukça düşük bulunmuştur. Karbapenem-dirençli *A.baumannii* suşlarının hiçbirinde *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{OXA-48}* genleri amplifiye edilmemiştir. Karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarında ise en sık *bla_{OXA-10}* (%26,8) geni saptanmış, bunu daha az sıklıkta tespit edilen *bla_{IMP}* ve *bla_{OXA-2}* izlemiştir. *P.aeruginosa* izolatlarının hiçbirinde *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{NDM}*, ve *bla_{OXA-48}* genleri amplifiye edilmemiştir (**Tablo 4.11**). İmipenem veya meropenem “intermediate” *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz genleri saptanmamıştır.

Tablo 4.11. Karbapenem-dirençli izolatlarda saptanan karbapenemaz genleri **A.** *A.baumannii* **B.** *P.aeruginosa*

A.

<i>A.baumannii</i> (s=226)								
Gen	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}
Sayı	2	0	0	0	226	195	2	2
%	0,9				100	86,3	0,9	0,9

=: Yüzde

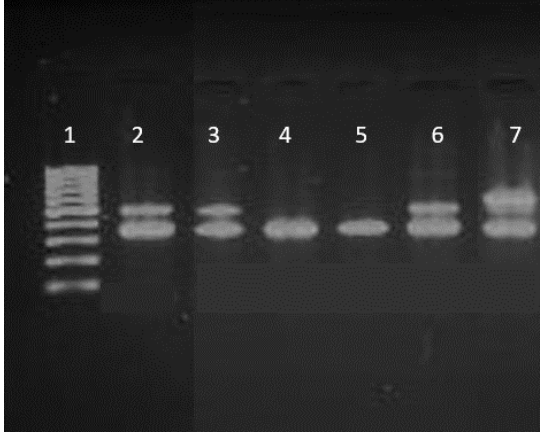
B.

<i>P.aeruginosa</i> (s=71)							
Gen	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{OXA-2}	<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{GES}
Sayı	0	3	0	0	1	19	0
%		4,2			1,4	26,8	

=: Yüzde

Karbapenem-duyarlı ve karbapenem “intermediate” suşların hiçbirinde karbapenemaz geni tespit edilmemiştir.

Karbapenem-dirençli *A.baumannii* alt popülasyonlarının tümünde *bla*_{OXA-51} geni, %75’inde (s=12) *bla*_{OXA-23} geni saptanmıştır. Karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* alt popülasyonlarının hiçbirinde karbapenemaz genleri amplifiye edilmemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Heterodirençli *A.baumannii* suşlarına ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

1. Moleküler ağırlık belirteci (100 bç)
2. OXA-51 (353 bç), OXA-23 (501 bç)
3. OXA-51 (353 bç), OXA-23 (501 bç)
4. OXA-51 (353 bç)
5. OXA-51 (353 bç)
6. OXA-51 (353 bç), OXA-23 (501 bç)
7. OXA-58 Pozitif kontrol suşu; OXA-58 (599 bç), OXA-51 (353 bç)

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelen *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* bakterilerinde karbapenemlere karşı görülen direnç sıklığı ülkeden ülkeye, hatta aynı ülkede farklı merkezler arasında değişkenlik göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, *A.baumannii* izolatlarında imipenem direnç sıklığının %3,1-96 arasında, meropenem direnç sıklığının ise %1,9-100 arasında olmak üzere oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir (**Tablo 5.1**). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *A.baumannii* izolatlarının imipeneme ve meropeneme karşı saptanan direnç oranlarının sırasıyla %56-100 ve %39-100 arasında olduğu belirlenmiştir (62). Bizim çalışmamızda ise *A.baumannii* kan izolatlarında imipenem direnç sıklığı %88,3 (s=226), meropenem direnç sıklığı %87,5 (s=224) olarak saptanmıştır.

Tablo 5.1. Uluslararası yapılan çalışmalarda *A.baumannii* izolatlarında saptanan karbapenem direnç oranları

Yıl	İzolat türü	Bölge/Ülke	Antibiyotik	Direnç sıklığı (%)	Kaynak
1997-2016	ÇKÖ	Asya-Pasifik	İmipenem	55,7	(63)
			Meropenem	56,2	
		Avrupa	İmipenem	58,1	
			Meropenem	60,5	
		Güney Amerika	İmipenem	53,1	
			Meropenem	54,6	
Kuzey Amerika	İmipenem	32			
	Meropenem	36,5			
2016	ÇKÖ	Japonya	İmipenem	3,1	(64)
			Meropenem	1,9	
2017	ÇKÖ	Brezilya	Karbapenem	15,4-25,9	(65)
1997-2016	Kan	K.Amerika	İmipenem	41,6	(66)
			Meropenem	43,8	
2020-2022	ÇKÖ	Avrupa	Karbapenem	0-96	(67)

ÇKÖ: Çeşitli klinik örnekler, G. Amerika: Güney Amerika, K. Amerika: Kuzey Amerika, %: Yüzde

P.aeruginosa suşlarında da *A.baumannii* izolatlarına benzer şekilde karbapenem direnç oranları ülkeler arasında değişkenlik göstermekte olup, yapılan çalışmalarda %3,5-93,3 olmak üzere birbirinden farklı direnç oranları tespit edilmiştir

(**Tablo 5.2**). Avrupa Antimikrobiyal Sürveyans Çalışması'nda 2016-2020 yılları arasında Türkiye'den izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında karbapenem direnç sıklığı %36,2-38,4 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında karbapenem direnci %10-46,8 arasında olmak üzere farklılık göstermektedir (68, 69, 70). Bizim çalışmamızda ise; *P.aeruginosa* kan izolatlarında CLSI duyarlılık sınır değerlerine göre imipenem ve meropenem karşı direnç oranları sırasıyla %43,4 ve %46,7; EUCAST duyarlılık sınır değerlerine göre ise sırasıyla %43,4 ve %40,1 olarak saptanmıştır.

Tablo 5.2. Uluslararası ve Türkiye'den yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa* izolatlarında saptanan karbapenem direnç oranları

Yıllar	İzolat türü	Bölge/ülke	Antibiyotik	Direnç Sıklığı (%)	Kaynak
1997-2016	Kan	K. Amerika	İmipenem	20	(66)
			Meropenem	16,3	
2009	ÇKÖ	Asya-Pasifik	İmipenem	34,6	(71)
			Meropenem	27	
2013	ÇKÖ	G. Amerika	Karbapenem	10,3-46,7	(72)
2014	ÇKÖ	ABD	Meropenem	17	(73)
2017	ÇKÖ	ABD	Karbapenem	10,3	(74)
2012	ÇKÖ	Türkiye	İmipenem	51,8	(62)
			Meropenem	43,8	
2020-2023	ÇKÖ	Avrupa	Karbapenem	3,5-73,1	(67)
2012	ÇKÖ	Türkiye	İmipenem	10	(68)
2014	ÇKÖ	Türkiye	Meropenem	46,8	(70)
2015	ÇKÖ	Türkiye	Karbapenem	37	(69)

ÇKÖ: Çeşitli klinik örnekler, G. Amerika: Güney Amerika, K. Amerika: Kuzey Amerika, %: Yüzde

Gram-negatif bakterilerde karbapenem direncine yol açan farklı mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar arasında en çok araştırma konusu olan karbapenemaz enzimleri, bakteriler arasında yayılma potansiyeli yüksek olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (50).

Grup A β -laktamazlardan biri olan KPC enzimini taşıyan *A.baumannii*, ilk kez Puerto Rico'da bir sağlık kuruluşundan rapor edilmiştir (75). Ribeiro ve arkadaşları, Brezilya'da hastanede yatan hastalardan izole edilen *A.baumannii* suşlarında *bla*_{KPC-2}

ve *bla_{KPC-3}* genlerini saptamışlardır (76). Çoğunlukla Tn4401 transpozonunda yerleşim gösteren *bla_{KPC}* geni, horizontal gen transferi ile başta Enterobacterales olmak üzere diğer gram-negatif bakterilerde geniş yayılım potansiyeline sahiptir. *bla_{KPC}* geninin *A.baumannii* suşları arasında horizontal yolla yayılma tehlikesi, hem karbapenem direnç sıklığında artışa hem de diğer antibiyotik sınıflarına karşı dirence yol açabilmesi yönünden endişe vericidir. *P.aeruginosa* izolatlarında ise *bla_{KPC}* geni ilk kez 2006 yılında Kolombiya’da rapor edilmiştir (77). ATLAS 2017-2019 sürveyans çalışması verilerine göre; karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında *bla_{KPC}* geninin bulunma sıklığı Asya-Pasifik bölgesinde %17,6, Latin Amerika’da %8, Kuzey Amerika’da %0,3, Avrupa’da %0,1, Orta Doğu ve Afrika’da %0,3 olarak saptanmış olup *bla_{KPC}*’nin tüm dünyadaki ortalama prevalansının %1,7 olduğu tespit edilmiştir (78). Çalışmamızda gerek *A.baumannii* gerekse *P.aeruginosa* izolatlarında *bla_{KPC}* geni saptanmamıştır.

Karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarında, imipenem hidroliz aktivitesine sahip GES enzimleri dünyanın farklı bölgelerinde, değişen oranlarda izole edilmektedir. Tarafdar ve arkadaşlarının çalışmasında (79) karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarının %87,5 oranında bu gene sahip oldukları belirlenmiştir. ATLAS 2017-2019 sürveyans çalışmasında, karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında *bla_{GES}* geni %2,9 oranında saptanmıştır (80). Bir başka çalışmada ise; *P.aeruginosa* suşlarında *bla_{GES}* bulunma sıklığının dünya genelinde %6 olduğu bildirilmiştir (81). Çalışmamızda karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarının hiçbirinde *bla_{GES}* geni amplifiye edilmemiştir.

Bir metallo- β -laktamaz olan NDM enzimi, 2009 yılında ilk kez Almanya’da bir hastadan izole edilmesinin ardından tüm dünyada yayılım göstermiştir (82). Karbapenem-dirençli *A.baumannii* suşlarında *bla_{NDM}* prevalansını araştıran çalışmalar oldukça az sayıdadır. Liu ve arkadaşlarının bir çalışmasında (83) çeşitli klinik örneklerden izole edilen, karbapenem-dirençli *A.baumannii* suşlarının %7,2’sinde *bla_{NDM}* geni saptanmıştır. *P.aeruginosa* suşlarında ise *bla_{NDM}* izolasyon sıklığı %0.1-5 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir (84, 85). Bizim çalışmamızda ise *bla_{NDM}* geni karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarında %0,9 oranında saptanırken, karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında tespit edilmemiştir.

Karbapenem direncine yol açan bir diğer metallo- β -laktamaz enzimi olan IMP, ilk kez 1992 yılında Japonya’da izole edilen bir *Pseudomonas* suşunda tanımlanmıştır. Tanımlanmasının ardından, *bla*_{IMP} integronlar aracılığıyla *P.aeruginosa* türü içinde ve Enterobacterales üyeleri arasında tüm dünyada yayılmıştır. Bir sürveyans çalışmasında karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında *bla*_{IMP} geni izolasyon sıklığının %0-21 arasında olmak üzere oldukça değişkenlik gösterdiği bulunmuştur (81). SHİE’den izole edilen karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarının dahil edildiği ERACE-PA sürveyans çalışmasında, Avrupa ülkelerinde karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında *bla*_{IMP} saptanma sıklığı %5 olarak bildirilmiştir (86). ATLAS sürveyans çalışmasında karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının IMP enzimi ekspres etme sıklığı dünya genelinde %2,3, Asya-Pasifik bölgesinde %4,3, Latin Amerika’da %3,7, Kuzey Amerika’da %1,1, Avrupa’da %1,7, Afrika ve Orta Doğu ülkelerinde %0,6 olarak belirlenmiştir (80). Küçükbaşmacı’nın 2010 yılında ve Aksoy’un 2013 yılında yaptıkları çalışmalarda (87, 88); karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında *bla*_{IMP} dahil, hiçbir metallo- β -laktamaz geni saptanmamıştır. Çalışmamızda karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının %4,2’sinde *bla*_{IMP} geni saptanmış olup, karbapenem-dirençli *A.baumannii* suşlarının hiçbirinde bulunmamıştır.

Enterobacterales ailesinde yer alan bakterilerde yaygın olarak bulunan *bla*_{OXA-48} geninin non-fermentatif bakterilerde tanımlandığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. İran’da yapılan bir çalışmada *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarının sırasıyla %92 ve %70,8 sıklıkta *bla*_{OXA-48} geni taşıdıkları belirlenmiştir (79). Hojabri ve arkadaşları (89) çalışmalarına dahil ettikleri *A.baumannii* suşlarında %56,5 sıklıkta *bla*_{OXA-48} saptamışlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 172 *A.baumannii* suşunun hiçbirinde bu gen tespit edilmemiştir (90). Çalışmamızda karbapenem-dirençli hiçbir izolatta *bla*_{OXA-48} geni saptanmamıştır.

Karbapenem hidroliz aktivitesine sahip oksasilinazlar, *A.baumannii* izolatlarında en sık saptanan karbapenemaz enzimleridir. Tayvan’da, 269 karbapenem-dirençli *A.baumannii* kan izolatının dahil edildiği bir çalışmada; *bla*_{OXA-51} geni izolatların tümünde, *bla*_{OXA-23} %88,1’inde, *bla*_{OXA-24} %4,1’inde saptanırken hiçbir izolatta *bla*_{OXA-58} geni bulunmamıştır (91). Brezilya’dan yapılan bir çalışmada, 103 karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatında *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-143} genleri sırasıyla %97,9 ve, %2,1 oranlarında saptanırken, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} ile *bla*_{OXA-48}

genleri gözlenmemiştir (92). Orta Doğu'da yapılan bir başka çalışmada (93); karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarında %85,7 sıklıkla *bla*_{OXA-23}, %3,6 sıklıkla *bla*_{OXA-58} genleri saptanmıştır. Ülkemizde Telli ve arkadaşlarının çalışmasında (94); karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarının %78'inde *bla*_{OXA-23}, %54'ünde *bla*_{OXA-51}, %12'sinde *bla*_{OXA-58} genleri bulunmuştur. Vural ve arkadaşlarının çalışmasında (95); karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarının tümünde *bla*_{OXA-51}, %93'ünde *bla*_{OXA-23} saptanırken, *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA-58} tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise karbapenem-dirençli *A.baumannii* izolatlarının tümünde *bla*_{OXA-51} tespit edilmiş, izolatların %86,3'ünde *bla*_{OXA-23}, %0,9'unda *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA-58} genleri saptanmıştır.

Önceden dar spektrumlu β-laktamaz enzimleri arasında tanımlanan OXA-2 ve OXA-10 enzimlerinin; karbapenem sınıfı antibiyotikleri, diğer karbapenemaz aktivitesine sahip oksasilinazlar kadar parçalayabildiği ve karbapenem MİK değerlerinde OXA-48 ile OXA-58 enzimlerine denk bir artışa sebep olabildiği gösterilmiştir (52). Ancak karbapenem-dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatlarında OXA-2 ve OXA-10 enzimlerini kodlayan genlerin prevalansının araştırıldığı çalışmalar, dünyada yok denecek kadar az sayıdadır. Telli ve arkadaşları (94) 51 karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* izolatını dahil ettikleri çalışmada, izolatlarda %14 sıklığında *bla*_{OXA-10} geni saptamışlardır. Çalışmamızda karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* suşlarında %1,4 sıklıkla *bla*_{OXA-2}, %26,8 sıklıkla *bla*_{OXA-10} geni tespit edilmiştir.

Non-fermentatif bakterilere kıyasla enterik basillerin enfeksiyonlarda daha sık izole edilmesi nedeniyle, Enterobacterales üyelerinde karbapenem direncinin yanı sıra heterodirenç varlığı da diğer bakterilere kıyasla daha sık araştırılmıştır. Sun ve arkadaşları, çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 332 *E.coli* izolatını dahil ettikleri, disk veya gradiyent test şeridi etrafında oluşan inhibisyon zonu içinde üreme olan izolatları HD'li kabul ettikleri çalışmalarında; imipenem ve meropenem HD sıklığını sırasıyla %25,0 ve %3,9 bulmuşlardır (96). Sancak ve arkadaşları(97), 301 *K.pneumoniae* ve *E.coli* kan izolatında karbapenem HD varlığını, DD testi ve PAP yöntemi ile araştırmış; izolatların %7'sinin (s=21) karbapenem HD'li olduğunu belirlemişlerdir. Da Silva ve arkadaşları (98), natif suşun karbapenem MİK değerinin en az dört katı konsantrasyonda antibiyotik içeren PAP plaklarında üreyebilen

izolatları HD'li kabul ettikleri çalışmalarında, 25 *Enterobacter cloacae* izolatında karbapenem HD sıklığını %8 olarak tespit etmişlerdir.

Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* başta olmak üzere, karbapenem-dirençli gram-negatif basillerin görülme sıklığının artmasıyla, non-fermentatif bakterilerde heterodirenç varlığı önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Literatürde *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem heterodirenci varlığının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcut olup (**Tablo 5.3**) bu konuyla ilgili olarak yapılan ilk çalışma 2005 yılında Pournaras ve arkadaşları (99) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar ayrıntılı olarak incelendiğinde, karbapenem heterodirencini tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemin (DD testi, antibiyotik gradiyent testi, PAP testi), değerlendirme kriterlerinin (DD ya da gradiyent testte zon içi üremenin PAP yapılmadan HD'li kabul edilmesi, PAP testinde değerlendirme kriteri olarak üremenin tam inhibe olduğu konsantrasyon ile üremenin hiç inhibe olmadığı konsantrasyon arasında en az iki, dört ya da sekiz kat farkın kabul edilmesi vb.), çalışmaya dahil edilen hasta gruplarının (duyarlı tüm izolatlara ya da seçilmiş izolatlara PAP uygulanması, sadece invaziv örneklerin ya da tüm klinik örneklerin dahil edilmesi) ve izolat sayılarının oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Örneğin Fernandez ve arkadaşlarının (39) ve Lee ve arkadaşlarının (100) çalışmalarında karbapenem diski çevresinde oluşan inhibisyon zonu içinde üremenin saptanması “heterodirenç” olarak kabul edilirken; Ikonomidis ve arkadaşlarının çalışmasında (101) bir suş için SMD ile tespit edilen karbapenem MİK değerinden daha yüksek bir konsantrasyonda antibiyotik içeren PAP plağında üreme saptanması durumu, HD olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla farklı çalışmalarda elde edilen sonuçların doğru bir şekilde birbiriyle karşılaştırılması mümkün olamamaktadır. Yine aynı nedenlerden dolayı karbapenem HD sıklığı *A.baumannii* izolatları için %8.7-%92.8 ve *P.aeruginosa* izolatları için %27.5-100 arasında değişmek üzere, çalışmadan çalışmaya büyük farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda ise diğer çalışmalardan farklı olarak, karbapenem duyarlı bulunan tüm izolatlarda HD varlığını araştırmak amacıyla hem DD ve gradiyent test yöntemleri hem de günümüzde altın standart yöntem olarak kabul edilen PAP yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmamızın güçlü yönüdür. Sonuç olarak, sadece kan izolatlarını dahil ettiğimiz çalışmamızda imipenem ve meropenem HD sıklığı sırasıyla

A.baumannii için %35,3 ve %37,8; *P.aeruginosa* için %57,9 ve %13,8 olarak saptanmıştır.

Tablo 5.3. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* türlerinde karbapenem heterodirencinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen verilerin özeti

Örnek türü	Yıl	Dahil edilen izolat sayısı	Antibi-yotik	Yöntem	Kabul edilen HD tanımı	HD Prev. (%)	Dirençli Alt Pl.un Tüm Pop.daki Sıklığı	Kaynak
<i>A.baumannii</i>								
ÇKÖ	2005	*	İMP MEM	DD Etest	İnhibisyon zonu/elips zonu içinde üreme olması	*	-	(99)
ÇKÖ	2012	141	İMP MEM	DD PAP	Natif popülasyona ait MİK değerinin ≥ 2 kat antibiyotik konsantrasyonlu PAP plağında üreme olması	20 24	$1,5 \times 10^{-7} - 6,3 \times 10^{-6}$ $1,4 \times 10^{-7} - 2,7 \times 10^{-6}$	(39)
ÇKÖ	2012	211	İMP MEM	DD	İnhibisyon zonu içinde üreme olması	29,8 37,6	- -	(102)
ÇKÖ	2009	14	İMP MEM	PAP	Natif suş MİK değerinden daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlu PAP plaklarında üreme olması	21,4 92,8	- $3 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5}$	(101)
ÇKÖ	2010	126	İMP	DD Etest	İnhibisyon zonu/elips zonu içinde üreme olması	8,7	-	(100)
<i>P.aeruginosa</i>								
SVS	2017	451	İMP	DD	İnhibisyon zonu içinde ≥ 3 koloni üreme olması	54,3	-	(37)
		8		PAP	Natif popül. MİK değerinden daha yüksek antibiyotik konsantrasyona sahip PAP plaklarında üreme olması	100	-	
		451	MEM	DD	İnhibisyon zonu içinde ≥ 3 koloni üreme olması	72,5	-	
		8		PAP	Natif popülasyonun MİK değerinden daha yüksek antibiyotik konsantrasyonuna sahip PAP plaklarında üreme olması	100	-	

Tablo 5.3. Devam

Örnek türü	Yıl	Dahil edilen izolat sayısı	Antibiyotik	Yöntem	Kabul edilen HD tanımı	HD Prev. (%)	Dirençli Alt Pop.un Tüm Pop.daki Sıklığı	Kaynak
ÇKÖ	2006	50	İMP	DD	İnhibisyon zonu içinde üreme olması Natif popülasyonun MİK değerinden daha yüksek antibiyotik konsantrasyonuna sahip PAP plaklarında üreme olması	27,5	-	(103)
		14		PAP		100	$1,2 \times 10^{-7} - 6,9 \times 10^{-5}$	
		50		MEM		DD	27,5	
		14		PAP		100	$1,1 \times 10^{-7} - 2,1 \times 10^{-5}$	
ÇKÖ	2011	21	İMP	PAP	Natif popülasyonun MİK değerinin ≥ 2 katı antibiyotik konsantrasyonuna sahip PAP plaklarında üreme olması	90,5	$5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-2}$	(104)
				MEM		85,7	$4 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-2}$	
ÇKÖ	2015	106	İMP	DD	İnhibisyon zonu içinde üreme olması	31,1	-	(105)
ÇKÖ	2020	131	İMP	DD	İnhibisyon zonu içinde üreme olması	35,1	-	(106)
				PAP				

ÇKÖ: Çeşitli klinik örnekler, DD: Disk difüzyon testi, HD: Heterodirenç, İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, PAP: Popülasyon analizi profili, Pl.: Popülasyon, Prev.: Prevelans, SVS: Steril vücut sıvıları, %: Yüzde

Çalışmamızda *P.aeruginosa* suşlarına PAP testi uygulandığında bazı HD'li suşların PAP plaklarında, büyük ve küçük morfolojiye sahip üremelerin olduğu fark edilmiş olup bu izolatlar ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. Antibiyotiksiz besiyerine pasajlanan bu suşlara karbapenem SMD testi yapılmış ve büyük kolonilerin karbapenem-dirençli, küçük kolonilerin karbapenem-duyarlı olduğu saptanmıştır. Literatürde *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem heterodirencinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde buna benzer bir bulguya rastlanmamıştır.

Sun ve arkadaşları, gram-negatif bakterilerde imipenem HD sıklığının, diğer karbapenem sınıfı antibiyotiklere göre daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Sun ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bu görüşe benzer şekilde, bizim çalışmamızda da *P.aeruginosa* suşlarında imipenem HD sıklığı (%57,9), meropenem HD sıklığından (%13,8) yaklaşık dört kat daha fazla bulunmuştur. Lee ve arkadaşları, imipenem maruziyeti sonucunda ADC-29 ve OmpA proteinlerinin ekspresyon düzeyinin artmasının, yüksek oranda imipenem HD saptanmasından sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (78). Bunun yanı sıra; imipenem selektif basıncının diğer karbapenem sınıfı antibiyotiklere kıyasla daha fazla görülmesinin de imipenem HD sıklığının daha yüksek saptanmasına yol açabileceği düşünülmektedir (96). *P.aeruginosa* suşlarında kromozomal yerleşim gösteren ve düşük düzeyde sentezlenen AmpC enziminin ortamda imipenem varlığında indüklenmesi de, bu suşlarda yüksek imipenem HD oranlarına sebep olabilir (106).

EUCAST kriterleri kullanılması durumunda, imipenem MİK değeri $\leq 0,001$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan *P.aeruginosa* izolatları duyarlı kabul edilirken; CLSI kriterlerine göre imipenem MİK değeri ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan izolatlar duyarlı kabul edilmektedir. Çalışmamızda CLSI kriterleri kullanılarak, imipenem-duyarlı olduğu belirlenen izolatlarda HD varlığı araştırılmıştır. CLSI kriterlerine göre duyarlı kabul edilen izolatlarda imipenem HD oranı yüksek bulunmuştur ancak aynı izolatlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde, izolatların hepsinin duyarlı olmayan kategoride yer aldığı görülmüştür. Bu bulgular, *P.aeruginosa* imipenem duyarlılık kategorisinin belirlenmesinde EUCAST sınır değerlerinin dikkate alınmasının, CLSI sınır değerlerine göre daha rasyonel bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak elde edilen bu veriler ışığında, CLSI sınır değerleri dikkate alınarak “imipenem-duyarlı” olarak raporlanan *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde imipenem kullanılması durumunda, bu suşlarda imipenem HD sıklığının yüksek olması sebebiyle, tedavi başarısızlığı elde edilebileceği ön görülmüştür.

Heterodirenç saptanmasında her ne kadar PAP yöntemi altın standart olarak kabul edilen bir yöntem olsa da bu yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması mümkün değildir. Dolayısıyla HD’in saptanması amacıyla uygulanması daha kolay alternatif yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışmamızda; altın standart kabul edilen PAP yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile DD ve gradiyent test yöntemleriyle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Buna göre; *A.baumannii*

izolatlarında difüzyon testlerinin bir arada İMP-HD saptama duyarlılığı %85,7, özgüllüğü %60, pozitif prediktif değeri (PPD) %42,9, negatif prediktif değeri (NPD) %92,3; MEM-HD saptama duyarlılığı %66,7, özgüllüğü %71,4, PPD %50, NPD %83,3 olarak belirlenmiştir. *P.aeruginosa* izolatlarında ise difüzyon testlerinin İMP-HD saptama duyarlılığı %39,4, özgüllüğü %54,5, PPD %56,5, NPD %37,5; MEM-HD saptama duyarlılığı %37,5, özgüllüğü %42,9, PPD %9,7, NPD %80,8 olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında DD ya da gradiyent test uygulamaları sırasında zon içi üremeler saptanması durumunda, bu izolatlara HD'li diyebilmek için PAP testinin uygulanması gerekmektedir. Zon içinde üreme görülmeyen ve duyarlı olarak kabul edilen izolatlar arasında da ne yazık ki HD'li izolatların olma olasılığı bulunmaktadır.

Literatür verileri incelendiğinde DD ve antibiyotik gradiyent testlerinin, HD tespitinde düşük duyarlılık ve özgüllüğe, yüksek yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik oranlarına sahip yöntemler olduğu sonucuna varan çalışmalar bulunmaktadır (4, 107, 108). Lopez-Camacho ve arkadaşları, HD tespitinde difüzyon testleri ve PAP testi ile elde edilen sonuçların uyumsuz olmasının sebebinin, bu testlerin uygulanma prensiplerindeki farklılıklardan ve testlerin saptayabildiği heterojen bakteri fenotiplerinin birbirinden farklı olmasından kaynaklanıyor olabileceğini öne sürmüşlerdir (5).

HD prevalansının belirlenmesinde karşılaşılan zorluklardan biri, literatürde üzerinde karar birliğine varılmış bir HD tanımının bulunmaması; bir diğer zorluk ise suşlarda HD varlığı araştırılırken kullanılan yöntemlerin (DD testi, gradiyent test, PAP, vb) birbirinden farklılık göstermesidir. Bunların yanı sıra altın standart yöntem olan PAP analizini kullanan çalışmalarda, HD'li bakterileri belirlemede kullanılan değerlendirme kriterlerinin de birbirinden farklılık göstermesi çalışmalar arası verilerin karşılaştırılmasında sorun yaratmaktadır. Bu çalışmalarda (natif popülasyonun MİK değerinden iki-kat veya sekiz-kat fazla MİK değerine sahip dirençli alt popülasyonların varlığı, klinik sınır değer üstündeki antibiyotik konsantrasyonlarında üreme varlığı) gibi "cut-off" değerleri kullanılmıştır (97). Literatürde farklı çalışmalarda kabul edilen HD tanımlarını dikkate alarak, kendi çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde bulduğumuz karbapenem HD sıklıkları, **Tablo 5.4**'te sunulmuştur. Çalışmamızda belirlediğimiz HD kriteri, diğer

HD tanımlarına göre heterodirenç fenotipine ait özellikleri tüm yönleriyle kapsayan ve HD'li popülasyonlar üzerine seçici bir kriterdir.

Tablo 5.4. Sonuçlarımız farklı HD tanımlama kriterlerine göre değerlendirildiğinde elde edilen karbapenem HD sıklıkları

Kabul Edilen Heterodirenç Tanımı	<i>A.baumannii</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
	İMP	MEM	İMP	MEM
Difüzyon temelli testlerde inhibisyon zonu içinde üreme olması	48,3	40	56,1	8,6
Suşa ait MİK değerinden daha yüksek antibiyotik konsantrasyonuna sahip PAP plağında üreme olması	48,3	50	84,2	41,4
Üremenin tamamen inhibe olduğu ve hiç inhibe olmadığı PAP plaklarının antibiyotik konsantrasyonları arasında ≥ 4 kat fark olması ve duyarlı bakteri kolonisi içinde dirençli alt popülasyon sıklığının $\geq 1 \times 10^{-7}$ olması	31	40	78,9	41,4
Üremenin tamamen inhibe olduğu ve hiç inhibe olmadığı PAP plaklarının antibiyotik konsantrasyonları arasında ≥ 8 kat fark olması VE duyarlı bakteri kolonisi içinde dirençli alt popülasyon sıklığının $\geq 1 \times 10^{-7}$ olması	24,1	30	57,9	13,8

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, PAP: Popülasyon analizi profili

HD'li bakteri popülasyonundaki dirençli alt popülasyonlar, antibiyotik baskısı ortadan kalktığı anda; direnç durumunu koruyabilir (stabil HD) veya direnç durumunu koruyamayarak duyarlı hale (stabil olmayan HD) dönüşebilir. HD'li suşlarda heterodirençin stabilitesinin incelendiği az sayıda çalışma bulunmakta olup, bu çalışmaların sonuçları **Tablo 5.5**'te özet şeklinde sunulmuştur. Çalışmamızda, İMP-HD'li *A.baumannii* suşlarında stabil HD ve stabil olmayan HD sıklıkları sırasıyla %71,4 ve %28,6; MEM-HD'li *A.baumannii* suşlarında stabil HD ve stabil olmayan HD sıklıkları sırasıyla %66,7 ve %33,3 olarak bulunmuştur. İMP-HD'li *P.aeruginosa* suşlarında stabil ve stabil olmayan HD sıklıkları sırasıyla %78,8 ve %21,2 saptanmıştır; MEM-HD'li *P.aeruginosa* suşlarında ise hem stabil hem de stabil olmayan HD sıklığı %50 olarak belirlenmiştir.

Tablo 5.5. Literatürdeki çalışmalarda bulunan stabil ve stabil olmayan HD sıklıkları

Bakteri	Antibiyotik	HD		Kaynak
		Stabil	Stabil olmayan	
<i>A.baumannii</i>	İMP	0	100	(101)
	MEM	100	0	
<i>P.aeruginosa</i>	İMP	78,9	21,1	(104)
	MEM	77,8	22,2	
<i>P.aeruginosa</i>	İMP	60,6	39,4	(105)
<i>P.aeruginosa</i>	İMP	100	0	(106)

HD: Heterodirenç, İMP: İmipenem, MEM: Meropenem

Heterodirenç fenotipi gelişimine yol açabilecek pek çok farklı mekanizma öne sürülmüş olmakla birlikte, esas mekanizma net olarak ortaya konulmuş değildir. Altta yatan mekanizmaları belirlemek amacıyla, PAP testi ile izole edilen dirençli alt popülasyonlardaki genotipik farklılıkların belirlenmeye çalışıldığı, az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmalarda; porin kanallarının mutasyonel inaktivasyonunun veya dışa atım pompalarının gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin karbapenem HD'inden sorumlu olabileceğini öne sürülmüştür. Lopez-Camacho ve arkadaşları, meropenem-dirençli *K.pneumoniae* alt popülasyonlarının çoğunda porin ekspresyonunda azalma tespit etmiş, bazı alt popülasyonlardaysa porin genlerinin arasında IS1 varlığını saptamışlardır (5). Bir diğer çalışmada, imipenem-HD'li *P.aeruginosa* suşlarında *oprD* geninde nükleotid delesyonları saptanmış olup, bu delesyonların porin yapısında küçülmeye ve böylece imipenem HD'ine yol açabileceği belirtilmiştir (106). He ve arkadaşlarının çalışmasında, karbapenem-dirençli *P.aeruginosa* alt popülasyonlarında natif suşlara göre *mexB*, *mexC*, *mexE* ve *mexX* dışa atım pompa genlerinin ekspresyonunun arttığı, *oprD* porin gen ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (37). Çalışmamızda porin ve dışa atım pompa genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler araştırılmamıştır.

Antibiyotiklerin hücre içine alınmasında azalma veya hücre dışına atılmasında artma haricinde, bakteride karbapenemaz gen ekspresyonunda artış, IS insersiyonu ile β -laktamaz genlerinin indüklenmesi veya tandem gen amplifikasyonları gibi birçok

genotipik deęişiklięin de karbapenem HD'ine neden olabileceęi dűşünülmektedir. Cuencha ve arkadaşları çalıřmalarında, karbapenem-dirençli *A.baumannii* alt popűlasyonlarında *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} ve *bla*_{AmpC} genlerinin kopya sayısının arttıęını saptamıřlardır (39). Karbapenem HD'li *E.cloacae* suřları ile yapılan bir çalıřmada ise dirençli alt popűlasyonlarda hiçbir karbapenem direnç geni amplifiye edilmemiřtir (98). Bir bařka çalıřmada HD'li *A.baumannii* izolatlarında *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} genlerinin “upstream” bűlgelerinde IS*AbaI* insersiyon sekansı varlıęı saptanmıř, IS eklenmesi ile promotűr bűlgesinde meydana gelen deęişiklięin, oksasilinaz gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artıřa sebep olduęu belirlenmiřtir (109). Bizim alıřmamızda; İMP-dirençli *A.baumannii* alt popűlasyonların tümünde (s=7, % 100) *bla*_{OXA-51}, beřinde (%71,4) *bla*_{OXA-23} geni; MEM-dirençli *A.baumannii* alt popűlasyonların tümünde (s=9, % 100) *bla*_{OXA-51}, yedisinde (%77,8) *bla*_{OXA-23} genleri bulunmuřtur. Karbapenem-dirençli *A.baumannii* alt popűlasyonların hiçbirinde *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{OXA-58} genleri saptanmamıřtır. İmipenem ve meropenem-dirençli *P.aeruginosa* alt popűlasyonlarının hiçbirinde *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10} ve *bla*_{OXA-48} genleri amplifiye edilmemiřtir.

Çalıřmamızda, *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suřlarında yüksek oranda karbapenem heterodirenci saptanmıřtır. Heterodirençli bakteri popűlasyonlarının, űzellikle baęıřıklık sistemi baskılanmıř kiřilerde persistan ve tekrarlayan enfeksiyonlara yol açabilmesi sebebiyle HD'li bakterilerin tespiti klinik açıdan bűyűk űneme sahiptir. Gűnűműzde HD saptanmasında altın standart yűntem olarak kabul edilen PAP testi emek yoęun, maliyeti yüksek ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin hizmet veren mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanamamaktadır. Bu laboratuvarlarda sıklıkla uygulanan DD testi ve antibiyotik gradiyent testi, yüksek HD prevalansına sahip hastanelerde HD taramak amacıyla kullanılabilir. Ancak alıřmamızda dięer çalıřmalarda elde edilen sonuçlara benzer olarak, bu testlerin karbapenem heterodirenci tespitinde dűřűk duyarlılık ve űzgűllűęe sahip olduęu bulunmuřtur. Bu sebeple, pozitif difűzyon testi sonuçlarının ve yüksek riskli hastalardan izole edilen suřlar ile elde edilen negatif sonuçların, altın standart PAP testi ile doęrulanması gerekmektedir.

Yapılan çalıřmalarla karbapenem HD geliřiminde en űnemli risk faktűrűnűn karbapenem kullanım űykűsű olduęu belirlenmiřtir (100). Karbapenem-duyarlı, İD'li *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında bakterinin eradikasyonu için

karbapenem kullanımının zorunlu olması ancak bununla birlikte karbapenem kullanımının karbapenem HD'ine yol açabilmesi, klinik yönden bir çıkmazdır. Hastalarda gereksiz karbapenem kullanımı önlenerek, hastalara karbapenem monoterapisi yerine karbapenem veya diğer antibiyotik sınıflarını içeren kombinasyon tedavileri başlanarak ve karbapenem tedavisi başlanan hastalarda tedavi süresinin, optimal tedavi süresini aşmamasına özen gösterilerek; karbapenem HD sıklığında artışın önüne geçilmesi mümkün olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Roy S, Chowdhury G, Mukhopadhyay AK, Dutta S, Basu S. Convergence of biofilm formation and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infection. *Frontiers in Medicine*. 2022;9.
2. Gellatly SL HR. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;67(3):159-73.
3. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(1):191-207.
4. Andersson DI NH, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(8):479-96.
5. López-Camacho E, Paño-Pardo JR, Sotillo A, Elías-López C, Martínez-Martínez L, Gómez-Gil R, et al. Meropenem heteroresistance in clinical isolates of OXA-48–producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019;93(2):162-6.
6. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):4943-60.
7. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(2):277-82.
8. Garry W. Procop DLC, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenber, Gail L. Woods. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 2017.
9. Lupo A, Haenni M, Madec J-Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology spectrum*. 2018;6(3):6.3. 01.
10. Migula W. Über ein neues system der bakterien. arbeiten aus dem bakteriologischen institut der technischen hochschule zu karlsruhe. 1894.
11. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*. 2011;19(8):419-26.
12. Lepe J, Martínez-Martínez L. Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Medicina Intensiva (English Edition)*. 2022.
13. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(2):130-55.
14. Sarshar M, Behzadi P, Scribano D, Palamara AT, Ambrosi C. *Acinetobacter baumannii*: an ancient commensal with weapons of a pathogen. *Pathogens*. 2021;10(4):387.
15. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:55.
16. Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence IS Aba1, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*. 2009;191(7):2414-8.
17. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12.
18. Fleming D, Niese B, Redman W, Vanderpool E, Gordon V, Rumbaugh KP. Contribution of *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides Pel and Psl to wound infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022:323.
19. Ali Bülent Cengiz NB, İlker Devrim *Pediatric Hastalarda Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar*: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri; 2020.

20. John E. Bennett MD RDM, / Martin J. Blaser MD. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Elsevier; 2019.
21. TC Sağlık Bakanlığı Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Rehberi [Internet]. 2019. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPOR_2021.pdf.
22. Mea HJ YP, Wong EH. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiol Res.* 2021;247:126722.
23. Litwin A, Rojek S, Gozdzik W, Duszynska W. *Pseudomonas aeruginosa* device associated–healthcare associated infections and its multidrug resistance at intensive care unit of University Hospital: polish, 8.5-year, prospective, single-centre study. *BMC Infectious Diseases.* 2021;21:1-8.
24. Sutherland R, Rolinson G. Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *Journal of bacteriology.* 1964;87(4):887-99.
25. Alexander HE, Leidy G. Mode of action of streptomycin on type b *Hemophilus influenzae*: II. Nature of resistant variants. *The Journal of experimental medicine.* 1947;85(6):607.
26. Nicoloff H HK, Levin BR, Andersson DI. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat Microbiol.* 2019;4(3):504-14.
27. Stojowska-Swędryńska K, Łupkowska A, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E. Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022;23(1):449.
28. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *The Journal of clinical investigation.* 1985;76(1):325-31.
29. El-Halfawy OM, Valvano MA. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PloS one.* 2013;8(7):e68874.
30. Zhang F, Li Q, Bai J, Ding M, Yan X, Wang G, et al. Heteroresistance to amikacin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Frontiers in Microbiology.* 2021;12:682239.
31. Singh A, Zhao X, Drlica K. Fluoroquinolone heteroresistance, antimicrobial tolerance, and lethality enhancement. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2022:1165.
32. Rizvanov AA, Haertlé T, Bogomolnaya L, Talebi Bezman Abadi A. *Helicobacter pylori* and its antibiotic heteroresistance: A neglected issue in published guidelines. *Frontiers in microbiology.* 2019;10:1796.
33. Dewachter L, Fauvart M, Michiels J. Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance. *Molecular cell.* 2019;76(2):255-67.
34. Band VI, Weiss DS. Heteroresistance: a cause of unexplained antibiotic treatment failure? *PLoS pathogens.* 2019;15(6):e1007726.
35. Band VI, Satola SW, Burd EM, Farley MM, Jacob JT, Weiss DS. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibiting clinically undetected colistin heteroresistance leads to treatment failure in a murine model of infection. *MBio.* 2018;9(2):e02448-17.
36. Band VI, Crispell EK, Napier BA, Herrera CM, Tharp GK, Vavikolanu K, et al. Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nature microbiology.* 2016;1(6):1-9.
37. He J JX, Yang S, Xu X, Sun K, Li C, Yang T, Zhang L. . Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2018;51(3):413-21.
38. Howard-Anderson J, Davis M, Page AM, Bower CW, Smith G, Jacob JT, et al. Prevalence of colistin heteroresistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and

- association with clinical outcomes in patients: an observational study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022;77(3):793-8.
39. Fernández Cuenca F SMC, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, Baño JR, Pascual A. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(6):472-7.
 40. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67:1027-52.
 41. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(4):e00031-19.
 42. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(10):e01076-18.
 43. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(8):a025247.
 44. RP. A. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289((1036)):321-31.
 45. Patrick R. Murray EJB, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology* 2009.
 46. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(suppl_1):S28-S36.
 47. Jacoby GA. β -Lactamase nomenclature. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1123-9.
 48. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(2):306-25.
 49. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):440-58.
 50. Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. Carbapenemases: transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules*. 2020;10(5):720.
 51. Kotsakis SD, Flach C-F, Razavi M, Larsson DJ. Characterization of the first OXA-10 natural variant with increased carbapenemase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(1):e01817-18.
 52. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2119-25.
 53. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12(9):826-36.
 54. Testing TECoAS. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2021.
 55. Institute CaLS. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2021.
 56. Aysegul Gozalan OU, Dilek Guldemir, Sibel Aydogan, Cigdem Kuzucu, Fatma Koksak Cakirlar, Ziya Cibali Açikgoz, Riza Durmaz. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Blood Culture Isolates from Three Hospitals in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2021;74(3):200-8.
 57. Poirel L NP. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-23.
 58. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(3):490-5.

59. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(4):351-3.
60. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2818-24.
61. Turton JF WN. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2974-6.
62. Leblebicioglu H, Cakir N, Celen M, Kurt H, Baris H, Laeuffer J. Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12(1):1-8.
63. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS, editors. *Antimicrobial susceptibility of Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2016). *Open forum infectious diseases*; 2019: Oxford University Press US.
64. Japan Nosocomial Infections Surveillance. Annual open report 2016. Available at: https://janis.mhlw.go.jp/english/report/open_report/2016/3/1/ken_Open_Report_Eng_2016_00_clsi2012.pdf. Accessed 1 February 2019.
65. Dias VMdCH, Silva DMWd, Burger M, Oliveira AASd, Capelo PdJ, Specian FAdR, et al. Active surveillance of carbapenem-resistant Gram-negative healthcare-associated infections in a low-middle-income country city. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2021;25.
66. Diekema DJ, Hsueh P-R, Mendes RE, Pfaller MA, Rolston KV, Sader HS, et al. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(7):e00355-19.
67. Organization WH. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data*2023.
68. Aktaş Z, Satana D, Kayacan Ç, Can B, Gönüllü N, Küçükbaşmacı Ö. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları ve beta-laktam direnç mekanizmalarının tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(3):386-97.
69. Durmaz S, Özer TT. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Abant Tıp Dergisi*. 2015;4(3):239-42.
70. Köse Ş, Atalay S, Ödemiş İ, Adar P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*. 2014;28(3):100-4.
71. Jean S-S, Hsueh P-R, Lee W-S, Yu K-W, Liao C-H, Chang F-Y, et al. Carbapenem susceptibilities and non-susceptibility concordance to different carbapenems amongst clinically important Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in Taiwan: results from the Surveillance of Multicentre Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2009. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(5):457-62.
72. Mendes RE, Mendoza M, Banga Singh KK, Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, et al. Regional resistance surveillance program results for 12 Asia-Pacific nations (2011). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5721-6.
73. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial activity of high-proportion cefepime-tazobactam (WCK 4282) against a large number of Gram-negative isolates collected worldwide in 2014. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(4):e02409-16.
74. Cai B ER, Magee G. Prevalence of carbapenem-resistant gram-negative infections in the United States predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Forum Infect Dis*. 2017.

75. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):1354-7.
76. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the bla KPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16:1-16.
77. Cuzon G, Naas T, Villegas M-V, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase bla KPC-2 gene in Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):5350-3.
78. Lee Y-L, Ko W-C, Hsueh P-R. Geographic patterns of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific Region: results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2015–2019. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2022;66(2):e02000-21.
79. Tarafdar F, Jafari B, Azimi T. Evaluating the antimicrobial resistance patterns and molecular frequency of bla_{oxa}-48 and bla_{GES}-2 genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. *New Microbes and New Infections*. 2020;37:100686.
80. Gales AC, Stone G, Sahn DF, Wise MG, Utt E. Incidence of ESBLs and carbapenemases among Enterobacterales and carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected globally: results from ATLAS 2017–2019. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2023:dkad127.
81. Reyes J, Komarow L, Chen L, Ge L, Hanson BM, Cober E, et al. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. *The Lancet Microbe*. 2023;4(3):e159-e70.
82. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld K-P, et al. Molecular characterization of bla NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(9):1998-2001.
83. Liu N, Zheng X, Zhu Q, He Z, Hu S. The Dissemination of NDM-1 in *Acinetobacter baumannii* Strains. *Current Microbiology*. 2022;79(4):117.
84. Yehouenou C, Bogaerts B, Vanneste K, Roosens NH, De Keersmaecker SC, Marchal K, et al. First detection of a plasmid-encoded New-Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) producing *Acinetobacter baumannii* using whole genome sequencing, isolated in a clinical setting in Benin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2021;20(1):1-7.
85. Zhang C, Qiu S, Wang Y, Qi L, Hao R, Liu X, et al. Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PloS one*. 2013;8(6):e64857.
86. Organization WH. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data. 2022.
87. Aksoy MD, Tuğrul HM. Investigation of metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains by phenotypic and genotypic methods. *Flora Infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2020.
88. Küçükbasmacı Ö, MİDİLLİ K, Issa G, Güven Ö, Gönüllü N. A new multiplex PCR method for rapid detection of genes encoding VIM and IMP types of metallo beta lactamases. *Türkiye Klinikleri tıp Bilimleri Dergisi*. 2010;30(4):1312-6.
89. Hojabri Z, Arab M, Darabi N, Kia NS, Lopes BS, Pajand O. Evaluation of the commercial combined disk test and minimum inhibitory concentration (MIC) determination for detection of carbapenemase producers among gram-negative bacilli isolated in a region with high prevalence of bla OXA-48 and bla NDM. *International Microbiology*. 2019;22:81-9.
90. Boral B UÖ, Ergin A, Durmaz R, Eser ÖK. *Acinetobacter* Study Group. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology

- of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019;18(1).
91. Wang T-H, Leu Y-S, Wang N-Y, Liu C-P, Yan T-R. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018;7:1-8.
 92. Romanin P, Palermo RL, Cavalini JF, Favaro LdS, De Paula-Petroli SB, Fernandes EV, et al. Multidrug-and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. *Microbial Drug Resistance*. 2019;25(9):1365-73.
 93. Elabd FM, Al-Ayed MS, Asaad AM, Alsareii SA, Qureshi MA, Musa HA-A. Molecular characterization of oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolates in a Saudi hospital. *Journal of Infection and Public Health*. 2015;8(3):242-7.
 94. Telli M, Eyigör M, Korkmazgil B, Aydın N, Atalay MA. *Acinetobacter* spp. klinik izolatlarında karbapenem direncinin moleküler epidemiyolojisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2017;47(4):190-6.
 95. Vural DG, Durupinar B. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması.
 96. Sun J, Huang S, Yang S, Pu S, Zhang C, Zhang L. Impact of carbapenem heteroresistance among clinical isolates of invasive *Escherichia coli* in Chongqing, southwestern China. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(5):469. e1-. e10.
 97. Sancak B, Arı O, Durmaz R. Whole-Genome Sequence Analysis of Carbapenem-Heteroresistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Current Microbiology*. 2022;79(12):384.
 98. Da Silva A, Martins A, Nodari C, Magagnin C, Barth A. Carbapenem-heteroresistance among isolates of the *Enterobacter cloacae* complex: is it a real concern? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018;37:185-6.
 99. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis A, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;55(6):1055-6.
 100. Lee HY CC, Wang SB, Su LH, Chen SH, Liu SY, Wu TL, Lin TY, Chiu CH. . Imipenem heteroresistance induced by imipenem in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanism and clinical implications. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(4):302-8.
 101. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(12):4055-9.
 102. Fernández-Cuenca F, Gómez-Sánchez M, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Vila J, Bou G, et al. Epidemiological and clinical features associated with colonisation/infection by *Acinetobacter baumannii* with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(3):235-8.
 103. Pournaras S IA, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 1):66-70.
 104. Oikonomou O PM, Ikonomidis A. Investigation of carbapenem heteroresistance among different sequence types of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates reveals further diversity. . *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 10):1556-8.
 105. Mei S GY, Zhu C, Dong C, Chen Y. . Research of the heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *Int J Clin Exp Med*. 2015;15;8:6129-32.

106. Xu Y ZX, Zeng W, Chen T, Liao W, Qian J, Lin J, Zhou C, Tian X, Cao J, Zhou T. Mechanisms of Heteroresistance and Resistance to Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist.* 2020;14;13:1419-28.
107. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMG, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2007;51(10):3726-30.
108. van Hal SJ, Wehrhahn MC, Barbogiannakos T, Mercer J, Chen D, Paterson DL, et al. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(4):1489-94.
109. Cuenca FF, Sánchez MdCG, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, et al. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents.* 2012;39(6):472-7.