

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas aeruginosa*
SUŞLARINDA KARBAPENEM DİRENÇ MEKANİZMALARININ
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Elif GÜLSOY

TRABZON-2024

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas aeruginosa*
SUŞLARINDA KARBAPENEM DİRENÇ MEKANİZMALARININ
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Elif GÜLSOY

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esra ÖZKAYA

TRABZON-2024

ÖNSÖZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda hoşgörüsü ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya

Asistanlığım ve eğitimim süresince bilgisi, tecrübesi, güler yüzü ve desteği ile eğitimimde büyük katkıları olan Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık eğitimim süresi boyunca destek ve yardımlarını gördüğüm çok değerli hocalarım Prof. Dr. Faruk AYDIN'a, Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Doç. Dr. Irmak BARAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Metin SANCAKTAR'a,

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım ve kendilerini tanımaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimimin başından sonuna kadar her daim bana destek olan değerli eşim Uzm. Dr. Adem GÜLSOY'a ve canım oğlum Ahmet'ime,

Beni büyütüp bugünlere kadar getiren anneciğim ve rahmetli babacığma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Elif GÜLSOY

ÖZET

Kan Kültüründen İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Karbapenem Direnç Mekanizmalarının Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Amaç: Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (KDPA) tüm dünyada önemli bir enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir. Bu çalışmada kan kültüründe üreyen *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnci ile ilişkili mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamıza kan örneklerinden üretilen KDPA izolatları dahil edildi. Karbapenem minimum inhibitör konsantrasyon değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Karbapenemaz üretiminin tespiti için karbapenem inaktivasyon metodu ve karbapenemaz genlerinin araştırılması için polimeraz zincir reaksiyonu kullanıldı. İndüklenebilir AmpC β -laktamaz tespiti için disk antagonizm testi yapıldı. Eflüks pompasının aşırı üretimi, eflüks pompa inhibitörü olan fenilalanin-arjinin β -naftilamid kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ve çeşitli eflüks pompa genlerinin (*mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle belirlendi. Porin proteini geni *oprD*'nin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile incelendi.

Bulgular ve Sonuç: Kan örneklerinden izole edilen 48 KDPA izolatı çalışmaya dahil edildi. İzolatların tamamı imipeneme, %97,9'u doripeneme, %75'i meropeneme dirençli ve %50'sinin çok ilaca dirençli olduğu saptandı. İzolatların 7'sinde (%14,6) fenotipik olarak karbapenemaz varlığı tespit edildi ve *bla_{VIM}* geni bulundu diğer karbapenemaz genleri ise tespit edilemedi. İzolatların 23'ünde (%47,9) indüklenebilir AmpC β -laktamaz varlığı saptandı. İzolatların 35'inde (%72,9) fenotipik olarak eflüks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edildi; 36'sında (%75) *mexY*, 5'inde (%10,5) *mexB*, 5'inde (%10,5) *mexF* ve 1'inde (%2) *mexD* eflüks pompası geninin aşırı ekspresyonu saptandı. İzolatların hiçbirinde *oprD* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı azalması belirlenemedi.

SUMMARY

Investigation of Carbapenem Resistance Mechanisms by Phenotypic and Molecular Methods in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Blood Culture

Objective: Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) is considered an important infection agent all over the world. This study aimed to investigate the mechanisms associated with carbapenem resistance in *P. aeruginosa* isolates grown in blood culture.

Methods: CRPA isolates grown from blood samples were included in our study. Carbapenem minimum inhibitor concentration values were determined by the broth microdilution method. The carbapenem inactivation method was used to detect carbapenemase production and the polymerase chain reaction was used to investigate carbapenemase genes. Disc antagonism test was performed for detection of inducible AmpC β -lactamase. Overproduction of the efflux pump was determined by the broth microdilution method using the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide and by real-time polymerized chain reaction (RT-PCR) of various efflux pump genes (*mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*). Expression levels of the porin protein gene *oprD* were examined by RT-PCR.

Results and Conclusions: 48 CRPA isolates isolated from blood samples were included in the study. All the isolates were resistant to imipenem, 97,9% were resistant to doripenem, 75% were resistant to meropenem and half were found to be multidrug resistant. The presence of carbapenemase was detected phenotypically in 7 of the isolates (14,6%), and the *bla_{VM}* gene was found, while other carbapenemase genes could not be detected. Inducible AmpC β -lactamase was detected in 23 (47,9%) of the isolates. Overexpression of the efflux pump was detected phenotypically in 35 (72,9%) of the isolates; Overexpression of the efflux pump gene *mexY* was detected in 36 (75%), *mexB* in 5 (10,5%), *mexF* in 5 (10,5%) and *mexD* in 1 (2%) of the isolates. No significant decrease in the expression level of the *oprD* gene was detected in any of the isolates.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iii
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi	3
2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri	5
2.1.3. Virulans Faktörleri.....	6
2.1.4. Epidemiyoloji	9
2.1.5. Enfeksiyonları.....	10
2.1.6. Enfeksiyonlarının Tedavisi	11
2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'da Karbapenem Direnç Mekanizmaları	13
2.2.1. AmpC Beta-laktamaz'ın Aşırı Üretimi Aracılı Direnç.....	13
2.2.2. Porin proteini OprD'nin Ekspresyonunun Azalması/Kaybı Aracılı Direnç	14
2.2.3. Efluks Pompalarının Aşırı Ekspresyonu Aracılı Direnç.....	15
2.2.4. Karbapenemaz Üretimi Aracılı Direnç	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri, Zamanı ve Araştırma İzni	23
3.2. Araştırmanın Evreni	23
3.3. Verilerin Toplanması.....	24
3.3.1. İmipenem ve Doripenem MİK Değerlerinin Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Saptanması	25
3.3.2. Karbapenemaz Varlığının Fenotipik Olarak Araştırılması.....	27
3.3.3. Karbapenemaz Varlığının Genotipik Olarak Araştırılması	27
3.3.4. AmpC beta-laktamazın Aşırı Üretiminin Fenotipik Olarak Saptanması ..	30

3.3.5. Efluks Pompası Aktivitesi Artışının Fenotipik Analizi	30
3.3.6. Efluks Pompası Genlerinin ve Porin Proteini Geninin Transkripsiyon Seviyelerinin Araştırılması	32
3.4. Etik konular	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Bakteri İzolatlarının Birimlere ve Yıllara Göre Dağılımı	39
4.2. Çalışma İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	41
4.3. Karbapenemaz Varlığının Fenotipik Olarak Araştırılması.....	46
4.4. Karbapenemaz Varlığının Genotipik Olarak Araştırılması	47
4.5. AmpC Aracılı Direncinin Fenotipik Olarak Saptanması.....	48
4.6. Efluks Pompası Aktivitesi Artışının Fenotipik Analizi.....	49
4.7. Efluks Pompası Genlerinin ve Porin Proteini Geninin Transkripsiyon Seviyelerinin Araştırılması	52
5.TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
6.1. Sonuç	78
6.2. Öneriler.....	78
KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR

CIM: Carbapenem inactivation method, Karbapenem inaktivasyon metodu

CRPA: Carbapenem resistance *P. aeruginosa*, Karbapenem dirençli *P. aeruginosa*

KDPA: Karbapenem dirençli *P. aeruginosa*

ÇİD: Çok ilaca dirençli

MİK: Minimum inhibitor konsantrasyon

LPS: Lipopolisakkarit

KF: Kistik fibrozis

QS: Quorum sensing, çoğunluğu algılama

VİP: Ventilatörle ilişkili pnömoni

MBL: Metallo-beta-laktamaz

PBP: Penisilin bağlayıcı protein

XDR: Extensively drug resistant, Yaygın olarak ilaca dirençli

SMR: Small multidrug resistance

MFS: Major facilitator superfamily

RND: Resistance/nodulation/cell division

ABC: ATP-binding cassette

MATE: Multidrug and toxic compound extrusion

PACE: Proteobacterial antimicrobial compound efflux

PMFP: Periplazmik membran füzyon proteini

OMF: Outer membrane factor, Dış mebran faktörü

AME: Aminoglycoside modifying enzyme, Aminoglikozit değiştirici enzim

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

KPC: *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz

GES: Guiana genişletilmiş spektrum

VIM: Verona imipenemaz

IMP: İmipenemaz

NDM: New Delhi metallobetalaktamaz

OXA: Oksasilinaz

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

DMSO: Dimetil sülfoksit

PBS: Phosphate buffer saline, Fosfat tamponlu salin

MHB: Mueller Hinton Broth, Mueller-Hinton sıvı besiyeri

CTX: Sefotaksim

FOX: Sefoksitin

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

MALDITOF-MS: Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry, Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon

PCR: Polymerase chain reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PCR: Real-Time PCR, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

PAβN: Fenilalanin-arjinin β-naftilamid

CCCP: Karbonil siyanür m-klorofenilhidrazon

DNA: Deoksiribonükleik asit

cDNA: Complementary DNA, Tamamlayıcı DNA

µg/ml: Mililitre başına bir mikrogram

µl: Mikrolitre

°C: *Celcius* derecesi

taq: *Thermus aquaticus*

CFU: Colony forming unit, Koloni oluşturan ünite

CFU/ml: Mililitre başına koloni oluşturan ünite

ATCC: American Type Culture Collection

ExoS: Ekzoenzim S

ExoT: Ekzoenzim T

ExoU: Ekzoenzim U

Exo Y: Ekzoenzim Y

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing,
Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi

g: Gravite, göreceli santrifüj kuvveti

Tm: Primer bağlanma sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> koloni görünümü.....	6
Şekil 2. <i>P. aeruginosa</i> 'da antibiyotik direncinde rol alan dört ana efluks pompasının şematik yapıları (MexAB-OprM, MexXY, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN)	18
Şekil 3. İzolatların yıllara ve gönderildiği birimlere göre dağılımı	41
Şekil 4. Karbapenemaz varlığının fenotipik olarak 'Karbapenemaz İnaktivasyon Metodu' (CIM) ile araştırılması.....	47
Şekil 5. VIM primerleri ile PCR işlemi sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü	48
Şekil 6. Disk antagonizm testi ile indüklenebilir AmpC β -laktamaz üretiminin gösterilmesi	49
Şekil 7. Çalışmadaki bazı <i>P. aeruginosa</i> suşlarının PA β N içeren ve içermeyen MHB besiyerinde meropenem sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları.	50
Şekil 8. PAO1 susuna ait iki farklı örnekte test edilen <i>oprD</i> , <i>rpsL</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> ve <i>mexF</i> 'nin RT-PCR işlemi sonucunda oluşan amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri	53
Şekil 9. PAO1 susuna ait iki farklı örnekte test edilen <i>oprD</i> , <i>rpsL</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> ve <i>mexF</i> 'nin RT-PCR işlemi sonrası erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi.....	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Klinik olarak önemli olan bazı <i>Pseudomonas</i> ların sınıflandırılması	3
Tablo 2. Floresan Grubunun Temel Özellikleri.....	4
Tablo 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri.....	7
Tablo 4. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunan RND efluks pompaları ve antibiyotik substratları ...	16
Tablo 5. PCR'de kullanılan oligonükleotid primerlerin sekansları, ampikon büyüklükleri	28
Tablo 6. PCR için hazırlanan reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları.....	29
Tablo 7. cDNA sentez karışımı içeriği	34
Tablo 8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri ve referansları.....	36
Tablo 9. Bir örnek için RT-PCR reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları.....	37
Tablo 10. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının izole edildikleri birimlere ve yıllara göre dağılımı	39
Tablo 11. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antibiyotik MİK değerleri ve duyarlılık kategorileri	43
Tablo 12. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara duyarlılık kategorileri	46
Tablo 13. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının MİK dağılımı, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	46
Tablo 14. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PAßN yokluğunda ve varlığında meropenem MİK değerleri.....	51
Tablo 15. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PAO1 suşuna kıyasla efluks ve porin genlerin göreceli ekspresyon seviyeleri	55
Tablo 16. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında farklı karbapenem direnç mekanizmalarının tespiti	57
Tablo 17. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında bulunan direnç mekanizması kombinasyonlarının prevalansı ve bu izolatların imipenem, meropenem ve doripenem MİK aralıkları. ..	61

1. GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonları, hastanelerde en sık karşılaşılan invazif enfeksiyonlardan biri olup, yüksek mortalite ve morbiditeye neden olduğu bilinmektedir. Ancak kan dolaşımı enfeksiyonlarında erken tanı ve tedavinin mortalite oranlarını düşürdüğü bildirilmiştir. Kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntemdir (1). Tüm dünyada nozokomiyal bakteriyemilerin sıklığı ve bakterilerin antibiyotiklere direnç oranları giderek artış göstermektedir.

Hastane kaynaklı enfeksiyonların %10 kadarından non-fermentatif gram negatif basiller sorumludur. Nozokomiyal bakteriyemiye neden olan bakteriler içerisinde *Pseudomonas aeruginosa* ön sıralarda gelmektedir (2). Hastanede yatan hastalarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların sıklığı giderek artmakta ve bunun sonucunda çoklu ilaca dirençli (ÇİD) izolatlar ortaya çıkmaktadır. Karbapenemler, ÇİD *P. aeruginosa* enfeksiyonunun tedavisinde en çok kullanılan antibiyotikler arasında bulunmaktadırlar (3, 4). Çeşitli ülkelerde *P. aeruginosa* izolatlarında yüksek düzey karbapenem direnç oranlarının geliştiği bildirilmiştir (5).

P. aeruginosa'nın karbapenem direnci, temel olarak, farklı direnç mekanizmalarının kombinasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu direnç mekanizmaları bakterinin dış membran geçirgenliğinin azalması, AmpC'nin aşırı üretimi, bakterinin çeşitli efluks pompalarının (MexAB–OprM, MexCD–OprJ, MexEF–OprN, MexXY–OprM) upregulasyonu ve karbapenemaz enzimlerinin üretimidir (4).

Bu çalışmada Ocak 2017 - Ocak 2022 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nin Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan örneklerinden üretilen imipenem ve/veya meropenem dirençli olduğu tespit edilen *P. aeruginosa* izolatlarının imipenem, meropenem, doripenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin; indüklenebilir AmpC β -laktamaz aracılı direnç varlığının; fenotipik olarak karbapenemaz varlığının; yaygın görülen karbapenemaz direnç genleri olan *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM}

varlığının; efluks pompası ve porin proteininin (OprD'nin) dirençteki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile bölgemizde tespit edilen invazif *P. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık oranları ile ilgili detaylı epidemiyolojik veri sunulacaktır. Ayrıca çalışma sonucunda karbapenem direncinde rol oynayan mekanizmalarla ilgili elde edilecek veriler, etkili tedavi protokollerinin planlanmasının yanı sıra mevcut antimikrobiyallerin etkili kullanımı, efluks pompa inhibitörlerinin tedavideki yeri ve yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi gibi konularda yapılacak olan araştırmalara önemli katkılarda bulunacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Fransız doktor Sédillot, 1850’de hastaların yaralarında mavi renkli akıntı tespit etmiş ve bu akıntının transfer edilebilir bir ajanla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Daha sonra 1862 yılında Lucke hasta yaralarında mavi renkli akıntıları incelemiş ve basil morfolojisinde mikroorganizmalar gördüğünü ifade etmiştir. Ardından 1882 yılında Carle Gessard bu akıntıya sebep olan organizmayı ilk kez kültürde izole etmiş ve bu organizmayı *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirilmiştir. Migula 1990 yılında, sahte anlamına gelen ‘pseudes’ ve birim anlamına gelen ‘monas’ yunanca terimlerinden oluşan *Pseudomonas* tanımını cins adı adlandırmıştır, bakterinin tür adı olarak ise *Pseudomonas pyocyanea* kullanılmıştır. Daha sonra kültürdeki koloni görünümü bakır pasına benzediğinden bu anlama gelen ‘aeruginosa’ terimi kullanılmıştır. Tür adı olarak *Pseudomonas aeruginosa* kullanımı kabul edilmektedir (6, 7).

Palleroni tarafından rRNA-DNA homoloji çalışmalarıyla psödomonadlar beş homolog rRNA grubuna ayrılmıştır. Daha sonra beş rRNA grubunun taksonomik olarak farklı genetik grupları temsil ettiği anlaşılmıştır ve sonuçta her rRNA grubu farklı isimlendirilmiştir (8). Psödomonaslar rRNA homoloji grup I’de yer almıştır. *Pseudomonadların fenotipik sınıflandırması* Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Klinik olarak önemli olan bazı *Pseudomonadların sınıflandırılması*

rRNA Homoloji Grup	Tür
Grup I	
Floresan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Nonfloresan	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>

Grup II	<i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksi <i>Burkholderia gladioli</i> <i>Cupriavidus türleri</i> <i>Ralstonia türleri</i>
Grup III	<i>Delftia acidovorans</i>
Grup IV	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>
Grup V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

* Tablo ilgili referans kaynaklardan yararlanarak oluşturulmuştur (9, 10).

rRNA homoloji grup I'de *Pseudomonas*'lar floresan veya nonfloresan olarak ayrılmaktadır. Floresan grubundaki türlerin hepsi uzun dalga boylu (400 nm) ultraviyole ışık altında floresans veren suda çözünür *piyoverdin* pigmenti üretmektedir. *P. aeruginosa* floresan grubunun bir üyesidir. Bu gruptaki üç bakteri *piyoverdin* üretmesine rağmen sadece *P. aeruginosa* *piyosiyenin* pigmenti üretmektedir. *P. aeruginosa*'nın 42°C'de üreyebilme özelliği de floresan grubundaki diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt ettirici bir özelliktir (Tablo 2) (9, 10).

Tablo 2. Floresan Grubunun Temel Özellikleri

Test	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Piyoverdin	+	+	+
Piyosiyenin	+	-	-
Asetamid	-/+	-	-
42°C'de üreme	+	-	-
Nitrat redüksiyonu	-/+	-/+	-
Jelatin hidrolizi	-/+	+	-

Tablo ilgili referans kaynaktan yararlanarak oluşturulmuştur (10).

2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, yaklaşık $0,6 \times 2 \mu\text{m}$ ölçülerinde, hareketli, gram negatif basil morfolojisinde bir bakteridir (9).

Pseudomonas aeruginosa'nın üremesi için basit ortam ve besin gereksinimlerinin olması nedeniyle, bakteri toprak ve bitki gibi çeşitli çevre koşullarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Birçok organik bileşiği karbon ve azot kaynağı olarak kullanabilirler. *P. aeruginosa*, basit beslenme gereksinimleri olması, geniş bir sıcaklık aralığında ($20-42^{\circ}\text{C}$) çoğalabilmesi, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olması, zayıf antiseptikler ve birçok antibiyotiğe karşı dirençli olması, nemli ortamlarda kolaylıkla üreyebilmesi gibi özellikleri nedeniyle fırsatçı patojen olarak da karşımıza çıkmakta ve hastane ortamında ciddi sorun oluşturmaktadır (10-12).

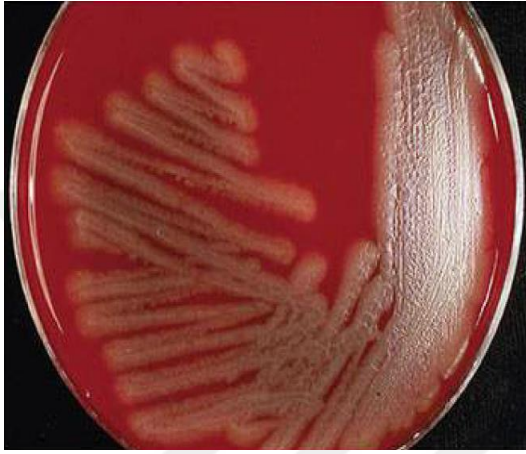
Pseudomonas aeruginosa sporsuz, karakteristik üzüm benzeri koku üreten, oksidatif fosforilasyon için son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanan zorunlu aerob bir bakteri olmasına rağmen son elektron alıcısı olarak nitratı kullanabilme özelliği nedeniyle anaerobik koşullarda da üreyebilmektedir (10, 12). *P. aeruginosa* glukozu fermente etmez, aerobik solunumda kullanır. *P. luteola* ve *P. oryzihabitans* türleri dışındaki diğer *Pseudomonas* türlerinin sitokrom oksidaz reaksiyonu pozitifdir. Laktoz ve sakkorozu kullanamazlar. Üç şekerli demirli besiyerinde (Triple Sugar Iron –TSI agar) alkali reaksiyon verir, hidrojen sülfür ve gaz oluşturmazlar. Üreaz, katalaz ve sitrat testleri pozitif; indol, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir. Birçoğu nitrat ve nitritlerden nitrojen gazı oluşturur. Karbon ve nitrojen kaynakları olarak aminoasitleri kullanabilirler (10).

P. aeruginosa MacConkey agar dahil tüm besiyerlerinde üreyebilir. Optimum üreme sıcaklığı 37°C 'dir ancak 42°C 'de de üreyebilirler (11). Bazı *P. aeruginosa* suşlarının kanı hemolize ettiği bilinmektedir. Bu suşlar koyun kanlı agarda β -hemoliz yapmış geniş gri koloniler şeklinde görünür ve bu koloniler sıklıkla timsah derisi görünümünde olup metalik bir parlaklık verir (Şekil 1A) (10).

Çoğu *P. aeruginosa* suşu kanlı agarda, floresan yeşilimsi görünümlü düz yuvarlak koloniler şeklinde ürer. Genellikle, *P. aeruginosa* agar içinde mavimsi

pigment olan *piyosiyanini* üretir. *P. aeruginosa*'nın çoğu suşu floresan pigment *piyoverdin*'i de üretir bu pigment Mueller-Hinton agarda yeşil renkte görünümünden sorumludur. Nadir olarak bazı suşların koyu kırmızı pigment olan *piyorubin* veya siyah pigment olan *piyomelanin* üretmektedir (9, 10).

Pseudomonas aeruginosa mukoid kolonilerinin, fazla miktarda polisakkarit kapsül üretimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Şekil 1B) (10, 11, 13).



1A



1B

Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* koloni görünümü

1A. *P. aeruginosa*'nın kanlı agardaki beta hemoliz yapmış, metalik parlaklığa sahip tipik koloni görünümünü; 1B. *P. aeruginosa*'nın MacConkey agardaki mukoid kolonilerinin tipik görünümü * *Şekil ilgili referans kaynaktan alınmıştır* (10).

2.1.3. Virulans Faktörleri

Pseudomonas aeruginosa'nın, konak dokusunda kolonizasyonunu ve enfeksiyonunu arttırdığı düşünülen çeşitli maddeler ürettiği bilinmektedir. Bu maddeler aljinat, pili, lipopolisakkarit gibi adezinler; proteazlar, fosfolipazlar gibi çeşitli enzimler; ekzotoksin A, enterotoksin gibi çeşitli toksinlerdir. Virulans faktörleri *P. aeruginosa*'yı nonfermenterler arasında önemli bir bakteri haline getirmektedir (Tablo 3)(10).

Tablo 3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virölans Faktörleri

	Virölans Faktörü	Biyolojik Aktivite
Adezinler	Pili	İnsan epitel hücresindeki GM-1 gangliyozid reseptörlerine bağlanarak bakterinin solunum yollarında kolonize olmasına ve hızla yayılmasına yardımcı olur.
	Lipopolisakkarit	Endodoksin oluşumundan sorumludur.
	Aljinat	Solunum epiteline <i>P. aeruginosa</i> 'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar.
Toksinler	Ekzotoksin A	Doku hasarından sorumludur. Protein sentezini inhibe eder ve makrofaj cevabını bozar.
	Enterotoksin	İshal oluşumundan sorumludur.
	Lökositin	Nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını inhibe eder.
	Piyosiyeninler	Solunum yolu epitelinin fonksiyonlarını bozar ve serbest radikallerin salgılanmasına neden olarak doku hasarını artırır.
Enzimler	Nöraminidaz	GM-1 gangliyozid reseptörlerinden sialik asit yapılarını uzaklaştırarak pilinin fonksiyonuna yardım eder.
	Ekzoenzim S	Protein sentezini inhibe eder.
	Fosfolipaz C	Sitoplazmik membranın ve akciğerde sürfaktanın parçalanması, opsoninlerin inaktivasyonundan sorumludur.
	Elastaz	Sürfaktan proteinlerinin, immunoglobulinlerin ve kompleman componentlerinin parçalanmasından sorumludur. Nötrofil aktivitesini bozar.

Tablo ilgili referans kaynaktan yararlanarak oluşturulmuştur (10).

Adezinler

P. aeruginosa'nın flagella, pili, lipopolisakkarit (LPS) ve aljinat gibi membran bileşenleri konak hücreye bağlanmasında önemli rol oynarlar. Ayrıca flagella ve pili sayesinde *P. aeruginosa* hareket yeteneği kazanır. Aynı zamanda pili, solunum epiteline tutunmayı böylece bakterinin solunum yollarında hızla yayılmasına ve kolonize olmasına yardımcı olur.

Lipopolisakkarit, çoğu gram negatif bakterinin dış membranında yer alan önemli bir yapısal bileşendir ve LPS'nin lipid A bileşeni bakterinin endotoksin aktivitesinden sorumludur. *P. aeruginosa* ile konak hücre etkileşiminde LPS'in önemli bir rol sergilediği ve doku dejenerasyonu ile oluşan kronik hasardan sorumlu olduğu bilinmektedir (9, 10, 13, 14).

Aljinat, bakteri yüzeyinde belirgin bir kapsül oluşumundan sorumlu mukoid ekzopolisakkarittir. Bu sayede bakteriyi fagositozdan ve antibiyotik etkisinden korur. Daha çok Kistik fibrozis (KF) hastalarında aljinat üretimini kontrol eden genlerin aktive olduğu ve bu nedenle hastalarda *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları ile uzun süreli kolonizasyona yol açtığı bilinmektedir (10, 13). Ayrıca aljinat üretiminin, KF hastalarında kötü prognoz ve yüksek mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (15).

Salgılanan Toksinler ve Enzimler

Ekzotoksin A'nın, *P. aeruginosa*'nın en önemli virülans faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir. Bu toksin, ADP ribozilasyon aktivitesi yoluyla konak hücrede protein sentezini bozar. Aynı zamanda Ekzotoksin A'nın doku hasarına neden olduğu da bilinmektedir (10, 13).

Tip III sekresyon sistemiyle bakteriden konak hücreye bakteriyel toksinler (ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU) salgılanır. Bu toksinler ile konak hücrede hücre içi sinyal bozulmasıyla epitel hasarı gelişir ve ardından hücre ölümü gerçekleşir. Bu sistem sayesinde bakteri konakçının bağışıklık yanıtından kaçır. Dolayısıyla Tip III sekresyon sistemi bakterinin insanda kolonizasyonunu, replikasyonunu ve yayılmasını kolaylaştırır (14).

Piyosiyanin serbest radikallerin salgılanmasına neden olarak solunum yolu epitelindeki doku hasarını artırır. Piyoverdin, *P. aeruginosa* 'da demir gereksinimini karşılamak için demiri bağlayan bir siderofordur. Ayrıca diğer virülans faktörlerinin salgılanmasını da düzenlediği bilinmektedir (13).

P. aeruginosa, LasA ve LasB elastazları, alkalın proteaz, LipC lipazları, fosfolipaz C ve esteraz A enzimleri olmak üzere geniş bir litik enzim grubunu içerir. Elastaz, elastin içeren dokulara zarar verir. Akciğer parankimal hasarına ve ektima gangrenozum denilen yaygın hemorajik lezyonlardan sorumludur. Alkalın proteaz ise *P. aeruginosa* 'nın dokudaki hasarına ve yayılmasına katkıda bulunur (10, 13, 14). Fosfolipaz C ise lipidleri ve lesitini parçalayan, doku hasarını kolaylaştıran, ısıya dayanıksız bir hemolizindir (13, 16).

Virülans faktörlerinin düzenlenmesinde, bakteriler arası iletişim sistemi olan Quorum sensing (QS) önemli bir rol oynar. QS sistemi, bakteri tarafından üretilen ve çevredeki diğer bakteriler tarafından algılanan sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bakterinin otoindükleyici olarak isimlendirilen bu sinyal moleküllerini üretilip dış ortama bırakmasıyla ortamdaki o bakterinin sayısının arttığı bilinmektedir. Aynı zamanda, bakterilerin hücre yoğunluğundaki artışına bağlı olarak virülans faktörlerin sentezini de arttırmaktadır. QS sistemi, *P. aeruginosa*'da proteazlar, elastaz, piyoverdin, piyosisyanin, ekzotoksin A üretiminin artması, biyofilm gelişiminin indüklenmesi, efluks pompasının ekspresyonun artması gibi birçok virülans faktörünün üretiminin düzenlenmesinde rol oynar (14, 17).

2.1.4. Epidemiyoloji

Pseudomonas aeruginosa, doğada toprakta, çürüyen organik maddelerde, bitki örtüsünde ve suda bulunmaktadır (13). Doğada geniş dağılımına ve toplum kökenli enfeksiyon potansiyeline rağmen ciddi enfeksiyonlar ağırlıklı olarak hastane kaynaklıdır (18). Hastane ortamında gıdalar, çiçekler, lavabolar, tuvaletler, yer paspasları, solunum cihazları, diyaliz ekipmanları, intravenöz mayi, lens solüsyonu, dezenfektan ve antiseptik solüsyonları gibi nemli alanlarda bulunur. *P. aeruginosa*, hastane ortamında kontamine eller, ekipman veya yüzeyler yoluyla hastalar arasında yayılabilir. Hastanede yatan ve bağışıklığı baskılanmış hastaların mikrobiyotasında

bulunabilir. Bağıışıklığı baskılanmış hastaların *P. aeruginosa* ile enfeksiyon geliştirme riski bağıışıklık sistemi normal olan hastalara göre yüksektir (13).

Amerika Birleşik Devletleri'nde *P. aeruginosa*, hastane servislerinde ventilatörle ilişkili pnömoninin (VİP) en yaygın nedeni, yoğun bakım ünitelerinde VİP'nin ikinci en yaygın nedeni, kateterle ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarının ise üçüncü en yaygın nedeni olarak görölmektedir (19).

2.1.5. Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonlarında, özellikle kan dolaşımı ve solunum yolu enfeksiyonlarında en sık görölen patojenler yer almaktadır (20) .

P. aeruginosa, hastane kökenli bakteriyemiye neden olan en yaygın gram negatif bakteriler arasındadır (21). *P. aeruginosa* bakteriyemisi, hastalarda önemli mortalite ve sağılık bakım maliyetlerinin artışı ile ilişkili ciddi bir enfeksiyondur. Kan dolaşımı enfeksiyonlarıyla ilişkili hastane mortalitesinin %20'den fazlasında *P. aeruginosa*'nın etken olduğı bilinmektedir (20).

Bağıışıklığı baskılanmış hastalara yapılan invazif işlemler *P. aeruginosa*'nın enfeksiyon riskini artırır (9). Lomber ponksiyon veya beyin cerrahisi işlemi sonrasında hastada *P. aeruginosa* ilişkili menenjit enfeksiyonu gelişebilir. Üriner kateter takılması sonrasında hastada *P. aeruginosa* ilişkili idrar yolu enfeksiyonu oluşabilir. Hastanın mekanik ventilatör cihazına bağlanmasıyla *P. aeruginosa* ilişkili solunum yolu enfeksiyonu gelişebilir (9, 13).

P. aeruginosa yüzücülerde otitis eksterna etkenidir genelde hafif seyreder. Diyabetli hastalarda ise invazif (malign) otitis eksternaya yol açabilir (9).

P. aeruginosa neden olduğı göz enfeksiyonu, en sık yaralanma veya cerrahi işlemlerden sonra ortaya çıkabilir ve genellikle ağır seyirlidir (9).

İmmun sistemi zayıflamış, cilt veya mukozal bariyerleri bozulmuş hastalarda *P. aeruginosa* kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açabilir ve genellikle ölümcül seyirlidir (9).

Hastanede yatan ve cilt bariyeri bozulan hastalarda *P. aeruginosa* sebep olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları sık görülür. Özellikle *P. aeruginosa*'nın neden olduğu sepsiste *ektima gangrenozum* olarak adlandırılan eritemle çevrili lezyonlar sık görülür. Ektima lezyonlarından Gram boyama ile mikroskopide *P. aeruginosa* görülebilir. Bu lezyonlar *P. aeruginosa* dışındaki organizmaların neden olduğu bakteriyemide beklenmez. Sağlıklı kişilerde kötü klorlanmış jakuziler ve yüzme havuzları ile ilişkili folikülit görülebilir. *P. aeruginosa* yara ve yumuşak dokuda sık enfeksiyon yapan etkenlerdendir. Yara ve yumuşak doku enfeksiyon bölgesinde mavi-yeşil akıntı olabilir (9, 13).

P. aeruginosa endokarditinin intravenöz ilaç kullanan kişilerde sık görüldüğü bilinmektedir (13).

2.1.6. Enfeksiyonlarının Tedavisi

P. aeruginosa enfeksiyonları, hızlı antimikrobiyal direnç gelişimi ve tedavi başarısızlığı nedeniyle tek antimikrobiyal ile tedavi edilememektedir. Bu nedenle tedavide antimikrobiyal ilaç kombinasyonları tercih edilmektedir (13).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde antipsödomonal penisilinin beta-laktamaz inhibitörü ile kombinasyonu (piperasilin-tazobaktam ve tikarsilin-klavulanik asit), tek başına veya beta-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyon halinde antipsödomonal sefalosporinler (seftazidim-avibaktam, seftolozan-tazobaktam, sefoperazon-sulbaktam ve sefepim) ve karbapenemler (imipenem, meropenem, doripenem) kullanılabilir (22).

Seftazidim ve avibaktam kombinasyonu, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) ve karbapenemaz enzimleri nedeniyle oluşan betalaktam direncinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Avibaktam sınıf A, sınıf C ve bazı sınıf D beta-laktamazları inhibe eder. Seftazidim/avibaktam'ın KPC ve OXA-48 karbapenemazları bulunan karbapenem dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarda etkili olduğu bilinmektedir. Ancak B sınıfı metallobetalaktamaz üreten suşlarda etkisizdir. Seftolozan/tazobaktam ise birçok A sınıfı ve bazı C sınıfı betalaktamazları inhibe ederek üçüncü kuşak sefalosporinlere ve/veya karbapenemlere dirençli *P.*

aeruginosa'ya karşı etkili olduğu bilinmektedir. Seftolozan/tazobaktam, B sınıfı metallobetalaktamaz üreten *P. aeruginosa* suşlarında etkisizdir (23). Antimikrobiyal Test Liderliği ve Gözetim programından elde edilen verilere göre meropenem dirençli *P. aeruginosa*'da seftazidim/avibaktam ve seftolozan/tazobaktam'ın meropenem-vaborbaktam'a göre daha etkili olduğu ifade edilmiştir (24).

Son yıllarda geliştirilen aztreonam-avibaktam, meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktam gibi beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları, metallo-beta-laktamaz (MBL) üretmeyen karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'da etkiliyken MBL üreten suşlarda sınırlı bir etkiye sahiptir (22). Çalışmalarda meropenem-vaborbaktam'ın *mexY* ve *ampC* aşırı ekspresyonun olan izolatlarda meropenemin aktivitesini arttırdığı görülmüştür (25).

Karbapenemler, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın tedavisinde en önemli terapötik ajanlardan biridir (22). Tüm karbapenem grubu antibiyotikler tedavi sırasında direnç ile ilişkilendirildiğinden genellikle *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları küresel olarak yaygınlaşmıştır (24, 26).

Siprofloksasin ve levofloksasin *P. aeruginosa*'ya etkili kinolon grubu antibiyotiklerdir. Levofloksasinin, sadece *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda siprofloksasine göre hiçbir avantajı yoktur. Sadece polimikrobiyal solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde levofloksasin endikedir. Kinolon grubu antibiyotikler *P. aeruginosa*'nın tedavisinde oral olarak kullanımı mevcut olan tek antibiyotik sınıfıdır (26).

Sefiderokol, serin ve metallo-betalaktamaz üreten *P. aeruginosa*'ya karşı etkilidir. Demir kanalına bağlı alım mekanizması nedeniyle porin proteini kaybından ve efluks pompalarının upregülasyonundan etkilenmez (27).

Aminoglikozidler tedavi esnasında direnç gelişiminin önlenmesi için beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilerek kullanımı önerilmektedir (6, 28).

Yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilememesi nedeniyle son derece toksik olmasına rağmen, ÇİD *P. aeruginosa*'da etkili olduğu bilinen kolistin son yıllarda yeniden kullanılmaya başlanmıştır ve sistemik enfeksiyonlarda etki mekanizması farklı bir antibiyotikle kombine edildiğinde kullanılabilir (28, 29).

2.2. *P. aeruginosa*'da Karbapenem Direnç Mekanizmaları

Karbapenemler, sitoplazmik membranın dış yüzünde yer alan ve peptidoglikan yapıyı oluşturan penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lerin inhibisyonu ile bakteri hücresinin ölümüne yol açarlar (4). Karbapenemler, ÇİD *P. aeruginosa* enfeksiyonunun kontrolü için son basamak tedavi seçenekleri arasında bulunmaktadır. Tüm dünyada *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnç oranlarının arttığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* özellikle hastanede yatan ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili olduğu bilinmektedir (3, 5).

P. aeruginosa'da karbapenem direnci, genellikle farklı direnç mekanizmalarının kombinasyonu şeklinde ortaya çıkmaktadır. *P. aeruginosa*'da karbapenem direnci ile ilişkilendirilen en sık mekanizmalar AmpC beta-laktamaz'ın aşırı üretimi, dış membran geçirgenliğinin azalması, eflüks pompalarının aşırı üretimi ve karbapenemazların üretimidir (4).

2.2.1. AmpC Beta-laktamaz'ın Aşırı Üretimi Aracılı Direnç

P. aeruginosa, indüklenebilir AmpC beta-laktamaz üretebilir. *P. aeruginosa*'nın sokak suşları düşük seviyede AmpC beta-laktamaz üretir ve bu suşların antipsödomonal penisilinlere, betalaktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı hassas olduğu bilinmektedir. Ancak AmpC beta-laktamaz üretimi indüklendiğinde *P. aeruginosa* çok miktarda enzim üretir hale gelir ve neredeyse tüm beta-laktamlara karşı direnç geliştirir (18, 30).

P. aeruginosa'da beta-laktamların çoğuna karşı direnç, AmpC beta-laktamaz üretiminin indüklenmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkarken, *P. aeruginosa*'da AmpC ile karbapenem direnci arasındaki ilişki hala tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmalarda AmpC beta-laktamaz aşırı üretiminin tek başına *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere duyarlılığını önemli ölçüde değiştirmedeği, ancak diğer direnç mekanizmalarının (efluks pompalarının aşırı üretimi, OprD porin downregülasyonu, karbapenemaz üretimi) eşlik etmesi halinde karbapenem direncine katkıda bulunabileceği bildirilmektedir. Birden fazla direnç mekanizmasının bir arada bulunabilmesi nedeniyle *P. aeruginosa*'da indüklenabilir AmpC beta-laktamazın klinik etkisini değerlendirmek zordur (18).

Yapılan çalışmalarda, AmpC beta-laktamazı aşırı üreten *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda AmpC beta-laktamaz aşırı üretimi olmayan suşlara göre daha fazla uygunsuz antibiyotik verildiği ve bu hastalarda kalıcı bakteriyemi riskinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle AmpC'yi aşırı üreten *P. aeruginosa* hızla tespit edilmeli ve hastaya uygun antibiyotik tedavisi zaman geçmeden başlanmalıdır (18).

2.2.2. Porin proteini OprD'nin Ekspresyonunun Azalması/Kaybı Aracılı Direnç

Gram negatif bakterilerde bulunan dış zar, antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girişini azaltan yarı geçirgen bir bariyerdir. Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın dış zarının geçirgenliğinin, *Escherichia coli*'nin %8'i kadar olduğu bildirilmiştir. Bu durum, *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı direncine kısmen katkıda bulunmaktadır (18). *Enterobacterales* takımı içerisindeki bakterilerinden farklı olarak *P. aeruginosa*'nın dış membranında genel difüzyon porinleri yoktur, bunun yerine besin maddelerinin alımı için spesifik kanal proteinleri mevcuttur. *P. aeruginosa*'nın ana dış membran porin proteini OprF'nin yapısal, adezyon ve sinyal verme gibi işlevleri vardır. Diğer porin proteinleri ise glikozun difüzyonunu sağlayan OprB ve OprB2, fosfat/pirofosfat alımında görevli OprP ve OprO, iki küçük dış zar proteini olan OprG ve OprH'dir. Bu porin proteinlerinden başka OprD (Occ) ailesine ait, OccD (8 üye) ve OccK (11 üye) olmak üzere on dokuz porin proteini mevcuttur (31).

Karbapenemlerin taşınmasında rol oynayan *P. aeruginosa* porin proteinleri OprD/OccD1, OprD/OccK7 ve OprP/OccD3'dir (32). OprD/OccD1, *P. aeruginosa*'nın dış zarındaki ikinci ana porin proteindir (31). OprD porin proteini, karbapenem grubu antibiyotikler için (imipenem, meropenem, doripenem) için

bağlanma bölgelerini içerdiğinden *P. aeruginosa*'da karbapenemlerin hücre içine alınmasında rol oynar. *P. aeruginosa*'da dış zardaki OprD proteininin ekspresyonunu azalması (downregülasyonu) veya kaybı karbapenemlerin bakteri hücrelerine girişini azaltır. Bu mekanizmanın *P. aeruginosa*'da karbapenem duyarlılığını azalttığı hatta karbapenem direncine neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. OprD proteini kaybindan karbapenemler etkilenirken diğer beta-laktamların etkilenmediği bilinmektedir (18, 33). OpdD/OccK7 ve OpdP/OccD3 porin proteinleri ise OprD/OccD1 porin proteininden farklı olarak meropenemin hücre içine taşınmasında rol oynarken, imipenemin hücre içine alınmasında rol oynamaz (32).

OprD porin proteini aracılı direnç, OprD porin proteininin transkripsiyonel ekspresyonunun azalması ve/veya OprD porin proteininin üretimini bozan mutasyonlar aracılığıyla gerçekleşebilir (18).

Çalışmalarda, OprD porin proteininin ekspresyonunun azalması veya kaybı imipenem, meropenem, doripenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini değişik seviyelerde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu MİK artışı imipenemi genel olarak direnç sınır noktasından yukarı taşıyarak *P. aeruginosa* suşunu imipenem için dirençli bir fenotip haline getirmektedir. Yine OprD porin proteininin ekspresyonunu azalması veya kaybının meropenem ve doripenem MİK artışına neden olduğu ancak bu artışın *P. aeruginosa* suşunu her zaman meropenem ve doripeneme dirençli bir fenotip haline getirmediği ifade edilmiştir. OprD porin proteininin ekspresyonunun azalması veya kaybının başka bir direnç mekanizmasıyla (efluks pompasının aşırı üretimi ve/veya karbapenemaz üretimi gibi) birlikteliğinde meropenem ve doripenem için dirençli bir fenotip oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir (18, 34).

2.2.3. Efluks Pompalarının Aşırı Ekspresyonu Aracılı Direnç

Hücreye porin aracılığıyla giren antibiyotik, membran ile ilişkili pompalar tarafından aktif dışa atım yoluyla bakteri hücrelerinde ilaç birikiminde azalmaya dolayısıyla antimikrobiyal etkide düşüşe neden olur. Tek bir efluks pompası farklı sınıflardaki ilaçları hücreden dışarı taşıyabileceğinden bu mekanizmalar genellikle

çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın olarak ilaca dirençli (Extensively drug resistant-XDR) bakteriyel enfeksiyonlara yol açar (7, 18).

Efluks pompalarının kendilerine özgü olarak substratları farklıdır. Bu özgülük efluks pompalarının substratlarını yakalama yeteneği ile ilgilidir. Efluks pompalarının ana substratlarından bazıları deterjanlar, antibiyotikler, organik çözücüler, boyalar, dezenfektanlar, aromatik hidrokarbonlar, katyonik biyosidler, serbest yağ asitleri, lipofilik ilaçlar, amfifilik ajanlar, antiseptikler, antikanser ilaçlar, ayrıştırıcılar ve anti-virulans bileşenlerdir (7, 18, 35).

Genel olarak, efluks pompalarını kodlayan genler kromozomaldır. Bilinen çoklu ilaç dışa atım kapasitesine sahip altı efluks pompa ailesi vardır. Bunlar small multidrug resistance (SMR) ailesi; major facilitator superfamily (MFS) ailesi; resistance/nodulation/cell division (RND) ailesi; ATP-binding cassette (ABC) ailesi; multidrug and toxic compound extrusion (MATE) ailesi ve yeni tanımlanan proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) ailesidir (7, 18).

P. aeruginosa'da bulunan efluks pompaların çoğu RND ailesine aittir ve toplam 12 RND sistemi vardır (18, 35). RND pompaları bir transmembran taşıyıcı, bir periplazmik protein ve bir dış membran transport proteinini olmak üzere üçlü bir sistemden oluşmuştur (7, 18).

Tablo 4. *P. aeruginosa*'da bulunan RND efluks pompaları ve antibiyotik substratları

Dışa Atım Pompaları	Antibiyotik substrat
MexAB-OprM	AMI, AMX, ATM, CAR, CR, MA, FEP, CFP, CFSL, CTX, FOX, CZOP, CPO, CES, CAZ, CZX, CRO, CXM, CHL, CTET, CIN, CIP, CLX, DP, DOR, ENX, ERY, FMOX, GEN, IPM, LVX, CLM, MEM, MOX, NAF, NAL, NOR, NOV, OFX, OMC, OTC, PG, PPA, PIP, PTZ, SPX, SPI, STN, SUL, TZB, TET, TIC, TOS
MexCD-OprJ	AMX, MA, FEP, CFP, CFSL, CTX, FOX, CZOP, CPO, CES, CZX, CRO, CXM, CHL, CTET, CIN, CIP, CLX, DOR, ENX, ERY, FMOX, LVX, CLM, MEM, NAF, NAL,

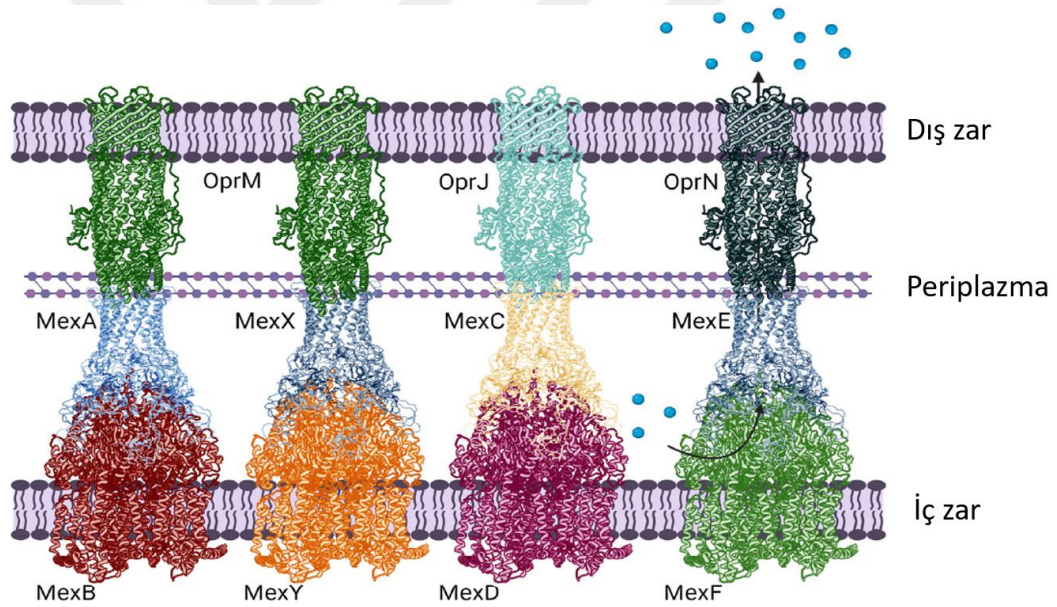
TMexCD-ToprJ	NOR, NOV, OFX, OMC, OTC, PG, PPA, PIP, SPX, SPI, TET, TOS FEP, CEQ, CAZ, CTET, CIP, DOX, ERV, FLO, GEN, MIN, NAL, OTC, STR, TET, TGC
MexEF-OprN	CHL, QN, TET, TMP
MexGHI-OpmD	ACR, NOR, TET, V
MexJK-OprM	ERY, TET, TCS
MexMN-OprM	ATM, BIPM, CAR, CMN, CAZ, CFT, CHL, MEM, MET, MOX, NOV, PIP, SUL, TMC, TP, TIC
MexPQ-OpmE	CHL, CIP, ERY, KIT, NOR, RKM, TET,
MexVW-OprM	CPO, CHL, ERY, NOR, OFX, TET
MexXY-OprM (-OprA)	AMI, AMX, MA, FEP, CFP, CFSL, CTX, FOX, CZOP, CPO, CAZ, CZX, CRO, CXM, CHL, CTET, CIN, CIP, CLX, DOR, ENX, ERY, FMOX, GEN, IPM, KAN, LVX, CLM, MEM, NAF, NAL, NEO, NOR, OFX, OMC, OTC, PG, PPA, PIP, PTZ, SPX, SPI, STR, TZB, TET, TIC, TOB, TOS, CAR (sadece OprA ile birlikte), SUL (sadece OprA ile birlikte)
MuxABC-OpmB	ATM, ERY, KIT, NOV, RKM, TET
TriABC-OpmH	TCS

AMI: amikasin; AMX: amoksisilin; ATM: aztreonam; BIPM: biapenem; CAR: karbenisilin; CAZ: seftazidim; CEQ: sefkinom; CES: sefsulodin; CFP: sefoperazon; CFSL: sefoselis; CFT: seftolozan; CHL: kloramfenikol; CIN: sinoksasin; CIP: siprofloksasin; CLX: kloksasilin; CMN: carumonam; CPO: sefpirome; CR: karvakrol; CRO: seftriakson; CTET: klortetrasiklin; CTX: sefotaksim; CXM: sefuroksim; CZOP: sefrozopran; CZX: seftizoksım; DOR: doripenem; DOX: doksisiklin; ENX: enoksasin; ERV: eravasiklin; ERY: eritromisin; FEP: sefepim; FLO: florfenikol; FMOX: flomoksef; FOX: sefoksitin; GEN: gentamisin; IPM: imipenem; KAN: kanamisin; KIT: kitasamisin; LVX: levofloksasin; MA: sefamandol; MEM: meropenem; MET: metisilin; MIN: minosiklin; MOX: mokzalaktam; NAF: nafsilin; NAL: nalidiksik asit; NEO: neomisin; NOR: norfloksasin; NOV: novobiyosin; OFX: ofloksasin; OMC: oleandomisin; OTC: oksitetrasiklin; PG: penisilin G; PIP:

piperasilin; PMA: piromidik asit; PPA: pipemidik asit; PTZ: piperasilin-tazobaktam; QN: kinolonlar; RKM: rokitamisin; SPI: spiramisin; SPX: sparfloksasin; STN: streptonigrin; STR: streptomisin; SUL: sulbenisilin; TET: tetrasiklin; TGC: tigesiklin; TİC: tikarsilin; TMP: trimetoprim; TOB: tobramisin; TOS: tosufloksasin; TP: tiamfenikol; TZB: tazobaktam; V: vanadyum.

Tablo ilgili referans kaynaktan yararlanarak oluşturulmuştur (7).

P. aeruginosa'da, RND süperailesine ait (MexAB-OprM, MexXY, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN) dört ana efluks pompası antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bu pompalar üç farklı proteinden oluşurlar. Bu proteinler yaygın olarak periplazmik membran füzyon proteini (PMFP) olarak bilinen MexA, MexX, MexC veya MexE, sitoplazmik membran transport proteinini olan MexB, MexY, MexD veya MexF ve kanal oluşturucu dış mebran faktörü (OMF) olarak bilinen OprM, OprJ veya OprN proteinleridir (Şekil 2) (7, 18, 35).



Şekil 2. *P. aeruginosa*'da antibiyotik direncinde rol alan dört ana efluks pompasının şematik yapıları (MexAB-OprM, MexXY, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN)

Şekil ilgili referans kaynaktan alınmıştır (7).

P. aeruginosa'da efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun, çoğu anti-psödomonal ilaca karşı dirençten sorumlu olduğu bilinmektedir bu nedenle yeni

antipsödomonal ilaçlar keşfedilirken bu akış mekanizmaları göz önünde bulundurulmalıdır (7).

Çalışmalarda, *P. aeruginosa*'da MexJK ve MexGHI-OpmD efluks pompalarının esas olarak Quorum-sensing (QS) mekanizmasında ve hücreler arası iletişimde rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca biyofilmlerde efluks pompası ekspresyon seviyesinin çok arttığı ve bunun sonucunda bakterinin antibiyotik direncinin de arttığı bildirilmektedir. Efluks pompası inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda ise efluks pompasının inhibisyonunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (7). Bu çalışmalardan efluks pompaları ve biyofilmlerin birbirlerinin düzenlenmesine etki ettiği anlaşılmaktadır.

MexAB-OprM efluks pompası, beta-laktam antibiyotiklerin çoğu, kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, novobiyosin dahil olmak üzere birçok sınıftan antibiyotiği hücreden dışarı atma kabiliyetine sahip bir pompadır. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarında MexAB-OprM ekspresyonu artmasıyla karbapenemlere karşı direnç geliştiği birçok çalışmada bildirilmiştir (7, 18). MexAB-OprM, sokak suşlarında yapısal olarak üretilir. MexAB-OprM efluks pompasının ekspresyonu esas olarak *mexR*, *nalC* ve *nalD* genleri tarafından kontrol edilmektedir. Antibiyotik kullanımıyla bakteride MexAB-OprM efluks pompası ekspresyon seviyesi aşırı artar ve bu *P. aeruginosa* suşları baskın hale gelir (7, 18).

MexCD-OprJ efluks pompasının aşırı ekspresyonu florokinolonlar, makrolidler, novobiyosin, tetrasiklinler, kloramfenikol ve sefepim ve sefpirom gibi dördüncü kuşak sefalosporin direnci ile ilişkilidir. *P. aeruginosa*'da MexCD-OprJ efluks pompasının esas olarak levofloksasin ve siprofloksasin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (7, 18, 35). Ancak yapılan bir çalışmada *mexD* genindeki bazı mutasyonlardan sonra pompanın substrat afinitesi değiştiği ve *P. aeruginosa*'da seftolozan-tazobaktam ve seftazidim-avibaktam gibi yeni betalaktam-betalaktamaz kombinasyonlarına direnç gelişimiyle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. MexCD-OprJ efluks pompasının ekspresyonu *nfxB* geni tarafından düzenlenir (7).

MexEF-OprN efluks pompasının aşırı ekspresyonu kloramfenikol, kinolonlar ve trimetoprim direnciyle ilişkilidir. MexEF-OprN efluks pompasının aşırı

ekspresyonunun *oprD* porin geninde downregülasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu mekanizma MexEF-OprN aşırı ekspresyonuyla oluşan karbapenem direncini açıklamaktadır. Ancak MexEF-OprN ve OprD proteinin birlikte regülasyonu her zaman gerçekleşmez (7, 18, 35).

MexXY efluks pompasının aşırı ekspresyonunun çoğu antipsödomonal antibiyotik direnciyle ilişkilidir. Ayrıca MexXY'nin aminoglikozit değiştirici enzimler (aminoglycoside modifying enzymes-AME) ile beraber aminoglikozit direncini artırmada etkili olduğu, dolayısıyla AME'leri taşıyan suşlarda MexXY efluks pompası ekspresyon seviyesinin aşırı arttığı bildirilmiştir (7).

2.2.4. Karbapenemaz Üretimi Aracılı Direnç

P. aeruginosa'da 1990 yılına kadar karbapenem direncinin kromozomal mutasyonlar yoluyla oluştuğu bilinmekteydi. MBL üreten *P. aeruginosa* klinik suşu ilk kez 1991 yılında bildirildi (36). Daha sonrasında karbapenem dirençli *P. aeruginosa* hareketli genetik elemanların etkisiyle hızla tüm dünyada yayıldı. Günümüzde *P. aeruginosa*'da A, B ve D sınıfı karbapenemazlar tespit edilmiş olup bunlardan B sınıfı karbapenemazlara ait olan MBL enzimleri en yaygın olanıdır. Karbapenemaz direnç genleri plazmitler, transpozonlar, integronlar ve profajlar üzerinde taşınabilir ve bakteriler bu direnç genlerini aynı veya başka bir bakteri türünden yatay gen transferi yoluyla alabilir. Bu mekanizmalar ile karbapenemaz üreten *P. aeruginosa* hızla yayılabilir (22, 37).

A sınıfı beta-laktamazlardan *P. aeruginosa*'da karbapenemaz aktivitesine sahip olanlar *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazı (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-KPC) ve Guiana genişletilmiş spektrum (Guiana extended spectrum-GES) enzimleridir. Bu gruptaki karbapenemazlar, karbapenemleri aktif olarak parçalar ve enzim aktiviteleri klavulanik asit tarafından kısmen inhibe olur (22). KPC üreten *P. aeruginosa* izolatu ilk olarak 2007 yılında Kolombiya'dan bildirildi ve sonrasında dünyanın çeşitli ülkelerinden izole edilmeye başlandı (38). GES enziminin karbapenemaz aktivitesinin sadece bazı varyantlarında olduğu bilinmektedir. Özellikle 170. aminoasit olan glisin asparagine veya serin ile değişimini ile karbapenemaz

aktivitesi kazandığı bilinmektedir. GES tipi karbapenemaz üreten *P. aeruginosa* ülkemizden ve dünyanın çeşitli ülkelerinden bildirilmiştir (22).

B sınıfı beta-laktamazlar, beta-laktamları hidrolize etmek için kofaktör olarak iki değerli katyonlara (Zn^{2+}) ihtiyaç duyan metallobetalaktamazlardır. Bu nedenle MBL'lerin aktivitesi ortamda Zn^{2+} şelatörü ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) varlığında azalır. MBL'lar penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenemleri parçalar fakat monobaktamları parçalamaz. *P. aeruginosa*'da bulunan karbapenemaz enzimlerinden en yaygın olanı metallobetalaktamazlardır. Tüm dünyada *P. aeruginosa*'nın klinik şuşlarında en çok Verona imipenemazlar (VIM) daha sonra ise imipenemazlar (IMP) yaygın olarak görülür. New Delhi metallobetalaktamazlar (NDM) da çeşitli ülkelerden bildirilmiştir ancak VIM'ler ve IMP'lerden daha az görülmektedir. Aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın klinik şuşlarında bölgesel olarak birçok farklı metallobetalaktamazlar da rapor edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın VIM, IMP ve NDM üreten şuşları kıtalararası yayılımı fazlayken diğer MBL'ları üreten şuşların daha çok bölgesel olarak yayıldığı tespit edilmiştir (22).

VIM-1 üreten *P. aeruginosa* suşu ilk olarak 1999 yılında İtalya Verona'da rapor edildi (39). Ardından 2000 yılında Fransa'da VIM-2 üreten *P. aeruginosa* suşu rapor edildi (40). VIM-2, VIM-1'e göre daha fazla karbapenemaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (41). Ayrıca VIM-2 üreten *P. aeruginosa*'nın dünyada daha sık bildirildiği tespit edilmektedir. Şu ana kadar 66 VIM varyantı tanımlanmış olup neredeyse tüm ülkelerden VIM üreten *P. aeruginosa* şuşları bildirilmiştir (22).

IMP üreten *P. aeruginosa* suşu ilk olarak 1991'de Japonya'dan bildirilmiştir (36). Şu ana kadar, 79 IMP varyantı tanımlanmış olup IMP, *P. aeruginosa* tarafından üretilen en yaygın ikinci karbapenemazdır (22).

NDM-1 üreten *P. aeruginosa*'nın ilk olarak 2011'de Sırbistan'da bildirilmiştir (42). NDM üreten *P. aeruginosa* şuşları daha çok Asya kıtasından bildirilmektedir (22).

D sınıfı betalaktamazlardan oksasilinaz (OXA) tipi karbapenemazlar *P. aeruginosa*'da nadir olarak bildirilmektedir. İlk olarak 2008'de *P. aeruginosa*'da OXA

tipi karbapenemaz rapor edildi (18). OXA-40, OXA-48, OXA-181 ve OXA-198 üreten *P. aeruginosa* suşları çeşitli ülkelerden bildirilmiştir (22).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri, Zamanı ve Araştırma İzni

Araştırmamız retrospektif özellikte olan bir çalışma olarak planlanmıştır. Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 24.02.2022 tarih ve 2022/6 protokol numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra yapıldı. Etik kurul onayı alındıktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında mevcut olan hasta izolatlarından çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun olanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Araştırmanın Evreni

Araştırmaya kabul edilme kriterleri:

- Ocak 2017 -Ocak 2022 tarihleri arasında gönderilen kan örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatları
- İmipenem MİK değeri >4 µg/ml ve/veya meropenem MİK değeri >8 µg/ml olan *P. aeruginosa* izolatları
- Aynı hastadan tekrarlayan üremeler olduğunda ilk izolat olması

Araştırmaya kabul edilmeme kriterleri:

- Ocak 2017'den önce ve Ocak 2022'den önce kan örneklerinden izole *P. aeruginosa* suşları
- Kan kültürü dışında diğer materyallerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları
- İmipenem MİK değeri ≤ 4 µg/ml ve meropenem MİK değeri ≤ 8 µg/ml olan *P. aeruginosa* izolatları

- Aynı hastadan tekrarlayan üremeler olduğunda ilk izolattan sonraki *P. aeruginosa* izolatları

3.3. Verilerin Toplanması

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2017-Ocak 2022 tarihleri arasında kan kültür şişelerine inoküle edilerek gönderilmiş olan kan örnekleri otomatize kan kültür sisteminde (BACTEC™ FX Blood Culture System) inkübe edildi. Üreme sinyali izlendiğinde kan kültür şişesinden alınan bir miktar örnek %5 koyun kanlı agar (Oxoid, İngiltere), Eosin Metilen Blue Agar (EMB) (Oxoid, İngiltere) ve çikolatamsı agara (Oxoid, İngiltere) inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi (43). İnkübasyon sonrasında *Pseudomonas* türlerine benzeyen Gram boyama işlemi ile gram negatif basil morfolojisinde olan, laktoz negatif, oksidaz pozitif, nonfermentatif koloniler Matrix Assisted Laser Desorption İonization (MALDI-TOF) (Bruker, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlama yapıldı (43). CrystalSpec™ Becton (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) nefelometre kullanılarak ID buyyonu içerisinde 0,5 McFarland (5×10^5 CFU/mL) yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonundan, antimikrobiyal duyarlılık test buyyona (ADT buyyon) 25 µL ilave edildikten sonra bir damla Phoenix™ AST (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) indikatörü damlatıldı. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları BD Phoenix M50™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) sisteminde NMIC-433 panelleri kullanılarak test edildi (43). Test sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre duyarlı, yüksek dozda duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (28). *P. aeruginosa* olarak tiplendirilen ve antimikrobiyal testleri çalışılan izolatlar, çalışma yapılncaya kadar %15 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -80°C’de saklandı (43).

Laboratuvar stoklarında bulunan imipenem ve/veya meropenem antibiyotiklerine dirençli tespit edilen izolatlar oda sıcaklığında çözöldükten sonra %5 kanlı agara pasajlanarak taze kültürleri hazırlandı. Meropenem, imipenem ve doripenem antibiyotiklerinin MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. İndüklenebilir AmpC üretiminin fenotipik tespiti için bu suşlara disk antagonizm testi

yapılmıştır. Bu izolatlarda karbapenemaz varlığının araştırılmasında fenotipik tarama testi olarak karbapenemaz inaktivasyon metodu kullanıldı. Fenotipik olarak karbapenemaz üreten suşlarda yaygın görülen karbapenemaz direnç genleri olan *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* varlığı geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırıldı. Eflüks pompasının aşırı üretiminin fenotipik olarak tespiti için sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile eflüks pompa inhibitörü (PAβN) içeren ve içermeyen Mueller-Hinton sıvı besiyerinde *P. aeruginosa* izolatlarının meropenem antibiyotigine karşı MİK değerleri tespit edildi. Ayrıca *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnciyle ilişkilendirilen çeşitli eflüks pompa genleri (*mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*) ve porin proteini OprD'nin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle belirlendi.

3.3.1. İmipenem ve Doripenem MİK Değerlerinin Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Saptanması

Karbapenem antimikrobiyal duyarlılık sonuçları, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST önerileri doğrultusunda belirlendi. Mikrodilüsyon testi için 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikrodilüsyon plakları kullanıldı. Plak üzerinde her bir sıra farklı izolatları içermektedir. Her bir izolat için sıvı mikrodilüsyon deneyleri 3 kez yapıldı.

Doripenem antibiyotik tozu üretici firmanın önerileri dikkate alınarak Dimetil sülfoksit (DMSO) ve Fosfat Tampon Tuz Çözeltilisi (PBS) içerisinde çözüldü ve son konsantrasyonu 1024 µg/ml olan doripenem çözeltisi elde edildi. Dimetil sülfoksitin antibakteriyel etkisi olmadığını göstermek için DMSO-PBS çözeltisi hazırlandı ve sıvı mikrodilüsyon testinde kontrol olarak kullanıldı ve besiyeri kontrolü dışında tüm kuyucuklarda bakteri üremesi beklendi.

İmipenem toz hali üretici firmanın önerileri dikkate alınarak steril distile su içerisinde homojen olarak çözdürülerek son konsantrasyonu 1024 µg/ml olan imipenem çözeltisi hazırlandı ve sıvı mikrodilüsyon testi için kullanıldı.

İmipenem ve doripenem MİK değerlerini saptamak için aşağıda belirtildiği şekilde sıvı mikrodilüsyon testleri gerçekleştirildi.

Öncelikle her kuyucuğa 50 µl katyon ayarlı MHB besiyeri konuldu. İmipenem veya doripenem sıvı mikrodilüsyon testi için konsantasyonu 1024 µg/ml olan antibiyotik solüsyonundan 50 µl alınıp 1. kuyucuğa aktarıldı ardından birkaç kez pipetleme yapıldı. Böylece 1. kuyucukta 100 µl besiyeri ve antibiyotik karışımı elde edildi. Ardından 1. kuyucuktan 50 µl alınıp 2. kuyucuğa aktarıldı ve 10. kuyucuğa kadar seri dilüsyon işlemi yapıldı. 11. ve 12. kuyucuğa antibiyotik solüsyonu eklenmedi. Ardından sıvı mikrodilüsyon testi çalışılacak bakterinin kanlı ağardaki taze pasaj kültüründen steril tuzlu su içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Plaklara inoküle edilen son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olması için hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/100 oranında dilue edildi. Bunun için 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak 990 µl taze katyon ayarlı MHB besiyerinin bulunduğu ependorfa aktarıldı ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Hazırlanan 5×10^5 CFU/ml bakteri süspansiyonu 11. kuyucuğa kadar tüm kuyucuklara 50 µl olacak şekilde pipetlendi. Ardından plaklar 37°C’de bir gece boyunca inkübe edildi ve sonrasında plaklar siyah zemin üzerinde çıplak göz ile değerlendirildi. *P. aeruginosa* suşlarının mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi ve not edildi. 11. kuyucukta besiyeri ve bakteri olduğundan tüm pleytlerde 11. kuyucukta üreme beklendi ve testin kendi içindeki pozitif kontrolü olarak kullanıldı. 12. kuyucuğa ise sadece besiyeri konulduğundan herhangi bir üreme beklenmedi ve testin kendi içindeki negatif kontrolü olarak kullanıldı. Ayrıca mikrodilüsyon testlerinde kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşları kullanıldı (3) .

Sonuçlar EUCAST standartlarına göre duyarlı, yüksek dozda duyarlı, dirençli olarak kategorize edildi (28). MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri izolatların sırasıyla %50 ve %90’ının inhibe edildiği en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlandı ve hesaplandı (44).

3.3.2. Karbapenemaz Varlığının Fenotipik Olarak Araştırılması

Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) testi, 2015 yılında Van Der Zwaluw ve arkadaşları tarafından karbapenemaz üreten gram-negatif basilleri saptamak için geliştirilmiştir (45). Bu çalışmada izolatlarda karbapenemaz varlığının araştırılmasında ilk olarak CIM kullanıldı. Ardından karbapenemaz üretimi tespit edilen tüm suşlarda sık görülen karbapenemaz genleri geleneksel PCR yöntemi ile araştırıldı. *P. aeruginosa* suşlarının kanlı agar besiyerindeki taze kültür pasajlarından 10 µl'lik öze dolusu bakteri alınarak 400 µl'lik steril distile su içerisine koyuldu ardından vortekslenerek bakteri süspansiyonu oluşturuldu. Daha sonra 10 µg'lık meropenem diski bu bakteri süspansiyonu içine koyularak 37°C'de iki saat inkübe edildi. Karbapenemaz inaktivasyon metodunda indikatör olarak kullanılmak üzere, *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlandı ve Müller Hinton agar plağına inokülasyonu yapıldı. Dört saatlik inkübasyonun sonunda bakteri süspansiyonu içinden meropenem diski alınarak *E. coli* ATCC 25922 inokülasyonu yapılan Müller Hinton agar plağı üzerine yerleştirildi. Kültür 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alındı. Meropenem diski çevresinde inhibisyon zonunun oluşmadığı izolatlar karbapenemaz üreten izolat olarak, inhibisyon zonunun oluştuğu izolatlar ise karbapenemaz üretmeyen izolat olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC BAA1705, negatif kontrol olarak ise *K. pneumoniae* BAA1706 suşları kullanıldı (45).

3.3.3. Karbapenemaz Varlığının Genotipik Olarak Araştırılması

Fenotipik olarak karbapenemaz üreten suşlarda *P. aeruginosa*'da yaygın görülen karbapenemaz direnç genleri olan *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* varlığı geleneksel PCR yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla izolatlardan kaynatma yöntemiyle DNA (deoksiribonükleik asit) izole edildi sonrasında direnç genlerine özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile ilgili gen varlığı araştırıldı (Tablo 5).

DNA İzolasyonu

İlk olarak izolatlardan 2.0 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu elde edildi. Vortekslenerek homojen hale gelmesinden sonra PCR tüplerine 20 µl bakteri

süspansiyonu pipetlendi. 99°C’de 15 dakika termal döngü cihazında kaynatma işlemine tabi tutuldu. Ardından bakteri DNA’sı bulunan bu PCR tüpleri santrifüj edildi. Bu işlemle elde edilen bakteri DNA’sı PCR işleminde kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

bla_{KPC}, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{VIM}* genlerinin tespiti için ayrı ayrı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Tablo 6’de gösterildiği miktarlarda kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve PCR işlemi yapıldı. Primerler 10 µM olacak şekilde steril distile su ile çözüldü. Reaksiyonda kullanılacak mastermix karışımı -20°C’den çıkarıldı ve çözüldükten sonra 5-10 saniye vortekslendi. 12,5 µl 2X Taq master mix (HibriGen-Türkiye) (KCl içeren PCR tamponu, 0,25 U/ µl Taq DNA Polimeraz, 0,4 mM dNTP, 3,2 Mm MgCl₂, Orange G boyası karışımı), 10 µM lık 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer eklenerek karışım hazırlandı ve üzerine 2 µl bakteri DNA’sı konularak son reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde steril distile su eklendi (Tablo 6). Böylece PCR reaksiyonu içeriği hazırlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri suşları Doç.Dr. Gülşen SARIKANAT GELMEZ (Marmara Üniveristesi, İstanbul)’den temin edildi. Negatif kontrol olarak ise deiyonize su kullanıldı (46).

Tablo 5. PCR’de kullanılan oligonükleotid primerlerin sekansları, ampikon büyüklükleri

Gen*	Primer Adı	Dizi (5’-3’)	Ampikon Büyüklüğü (bp)	Referans
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	882	(47)
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	GATGGTGTGTTGGTCGCATA	390	(46)
	VIM-R	CGAATGGCAGCCACCAG		
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	TTGACACTCCATTTACDG ^b	139	(46)
	IMP-R	GATYGAGAATTAAGCCACYCT		

<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GAAGCTGAGCACCGCATTAG	982	(48)
	NDM-R	GGGCCGTATGAGTGATTGC		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743	(49)
	OXA48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG		

* Primer dizilimleri parantez içindeki ilgili referanslardan alınmıştır

Tablo 6. PCR için hazırlanan reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon bileşeni	Bir örnek için
2X Taq Master Mix	12,5 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
DNA	2 µl
Distile su	6,5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

Genlerin Amplifikasyonu

PCR işlemi termal döngü cihazı (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) kullanılarak yapıldı. *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} genlerine spesifik reaksiyonlarda termal siklus programı olarak 95°C’de 3 dakika denatürasyon sonrası; her döngü için 95°C’de 30 saniye denatürasyon, 57°C’de 60 saniye primer birleşmesi, 72°C’de 60 saniye polimerizasyon aşamalarını içeren 30 döngü uygulandı ve 72°C’de 10 dakika polimerizasyon süresi eklendi (46). *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{KPC} genlerine spesifik reaksiyonlarda termal siklus programı için primer birleşmesi sırasıyla 58°C, 62°C ve 62°C olarak kullanıldı (47-49).

Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Polimeraz zincir reaksiyonunun sonunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Bunun için içerisinde 0,5 µg/mL etidyum bromür katkılı

%2'lik agaroz jel hazırlandı. Her bir reaksiyon tüpünden 5 µL alındı ve 1 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 3 µL 100 bp adımlı DNA markerı (Softec, Türkiye), ikinci kuyucuğa pozitif kontrol, diğer kuyucuklara PCR reaksiyonları yüklendi. Örnekler önce 10 dakika boyunca 100 voltta yürütüldü, daha sonra 30 dakika boyunca 120 voltta yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV transilluminatörde incelendi. DNA markerın oluşturduğu bantlar ile PCR reaksiyonlarının oluşturduğu bantlar kıyaslanarak bant varlığı yönünden değerlendirildi. Ardından Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kaliforniya, ABD) cihazında oluşan bantların fotoğrafı çekildi.

3.3.4. AmpC beta-laktamazın Aşırı Üretiminin Fenotipik Olarak Saptanması

İndüklenebilir AmpC beta-laktamazların saptanması daha önceki çalışmalara benzer şekilde disk antagonizm testi ile yapıldı (50, 51). Tüm *P. aeruginosa* suşlarının taze pasaj kültürlerinden steril tuzlu su içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra steril eküvyonlu çubuk ile Müller Hinton agar plağına inoküle edildi. Ardından sefotaksim (CTX) 30 µg ve sefoksitin (FOX) 30 µg diskleri plak merkezine 20 mm arayla yerleştirildi. Ardından plaklar 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Sefotaksim inhibisyon zon bölgesinin Sefoksitin diskine bakan tarafta körelmesi indüklenebilir AmpC beta-laktamaz üretimi için pozitif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşu kullanıldı.

3.3.5. Efluks Pompası Aktivitesi Artışının Fenotipik Analizi

P. aeruginosa'da efluks pompası aracılı karbapenem direncinin yaygınlığını belirlemek için fenotipik analiz yapıldı.

Efluks pompasının aşırı üretiminin fenotipik olarak tespiti için, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile efluks pompa inhibitörü (PAβN) içeren ve içermeyen MHB besiyerinde *P. aeruginosa* izolatlarının meropenem antibiyotikine karşı MİK değerleri eş zamanlı olarak tespit edildi. Bunun için aşağıda belirtildiği prosedürde sıvı mikrodilüsyon testleri gerçekleştirildi.

Mikrodilüsyon testi için 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikrodilüsyon plakları kullanıldı. Her bir izolat için plak üzerinde bir sıra kullanıldı. Sıvı mikrodilüsyon testinde kullanılan antibiyotiklerin toz hali üretici firmadan temin edildi.

Meropenem toz hali üretici firmanın önerileri dikkate alınarak steril distile su içerisinde homojen olarak çözdürüldü ve son konsantrasyonu 2048 µg/ml olan meropenem çözeltisi hazırlandı ve sıvı mikrodilüsyon testi için kullanıldı.

PAβN toz hali üretici firmanın önerileri dikkate alınarak DMSO ve MHB içerisinde homojen olarak çözdürüldü ve son konsantrasyonu 100 µg/ml olan PAβN çözeltisi elde edildi.

İnhibitör yokluğunda ve varlığında meropenem MİK değerlerinin karşılaştırılabilmesi için bir plak meropenem, bir plak meropenem + PAβN olacak şekilde testler tasarlandı. Öncelikle her kuyucuğa 50 µl katyon ayarlı MHB besiyeri konuldu. İnhibitörlü ve inhibitörsüz sıvı mikrodilüsyon testi için konsantrasyonu 2048 µg/ml olan meropenem solüsyonundan 50 µl alınıp birinci kuyucuğa aktarıldı ardından birkaç kez pipetleme yapıldı. Böylece birinci kuyucukta 100 µl besiyeri ve antibiyotik karışımı elde edildi. Ardından birinci kuyucuktan 50 µl alınıp ikinci kuyucuğa aktarıldı ve seri dilüsyon işlemi 10. kuyucuğa kadar devam etti. 11. ve 12. kuyucuğa antibiyotik solüsyonu eklenmedi. Ardından inhibitörsüz plaklarda tüm kuyucuklara 50 µl MHB besiyeri, inhibitörlü plaklarda ise tüm kuyucuklara konsantrasyonu 100 µg/ml olan PAβN solüsyonundan 50 µl ilave edildi. Ardından sıvı mikrodilüsyon testi çalışılacak bakterinin kanlı ağardaki taze pasaj kültüründen steril tuzlu su içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Plaklara inoküle edilen son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olması için hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/100 oranında dilue edildi. Bunun için 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak 990 µl taze katyon ayarlı MHB besiyerinin bulunduğu ependorfa aktarıldı ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Hazırlanan 5×10^5 CFU/ml bakteri süspansiyonu inhibitörlü ve inhibitörsüz plaklarda 11. kuyucuğa kadar tüm kuyucuklara 100 µl olacak şekilde pipetlendi. Böylece tüm plaklarda meropenem başlangıç konsantrasyonu 256 µg/ml, inhibitörlü plaklarda tüm kuyucuklarda PAβN konsantrasyonu 25 µg/ml oldu. Ardından plaklar 37°C'de bir

gece boyunca inkübe edildi ve sonrasında plaklar siyah zemin üzerinde çıplak göz ile değerlendirildi. *P. aeruginosa* suşlarının mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi ve not edildi. Tüm pleytlerde 11. kuyucukta bakteri üremesi beklendi ve testin kendi içindeki pozitif kontrolü olarak kullanıldı. 12. kuyucukta ise herhangi bir üreme beklenmedi ve testin kendi içindeki negatif kontrolü olarak kullanıldı. Aynı zamanda PAβN'nin bakteri üremesi üzerinde etkisi olmadığını görmek için, bakteriler meropenem olmadan tek başına akış pompası inhibitörü ile test edildi. Ayrıca mikrodilüsyon testlerinde kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* PAO1 suşları kullanıldı. İnhibitör varlığında meropenem MİK değerlerinin dört kat veya daha fazla azalması efluks pompasının aşırı ekspresyonu olarak kabul edildi (43, 52-54).

3.3.6. Efluks Pompası Genlerinin ve Porin Proteini Geninin Transkripsiyon Seviyelerinin Araştırılması

mexB, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *oprD* gen bölgelerinin transkripsiyon ürün düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle belirlendi. Öncelikle bakteriyel izolatlardan tüm RNA (Ribonükleik asit) izole edildi sonrasında bu RNA örneklerinden cDNA (tamamlayıcı DNA-complementary DNA) sentezlendi. İlgili genlerin transkriptlerinin seviyesi SYBR green boyası içeren RT-PCR master mix kullanılarak LightCycler 480 cihazında (Roche, Almanya) belirlendi. *rpsL* geni (housekeeping gen) aynı işlemlere tabi tutularak referans gen olarak kullanıldı. Yani *rpsL* geni efluks ve porin genlerinin transkripsiyon seviyelerinin normalleştirilmesi için kullanıldı (4, 30).

İlgili genin referans gene göre göreceli (relative) kantifikasyonu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri temel alınarak hesaplandı.

Bakteri Tüm RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için çalışmaya alınan suşların kanlı agar besiyerine ekimleri yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübe edilen örnekler FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Hazırlanan 3,0 McFarland bakteri çözeltisinin 1 ml'si 2 ml'lik vidalı santrifüj tüpüne aktarıldı ve 18000 g'de 2 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi ardından bakteri çözeltisinde üstte kalan süpernatant kısmı atıldı ve dipteki çökelti üzerine 100 µl lizozim eklendi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 350 µl FARB Buffer ve 3,5 µl β-Merkaptoetanol eklendi ve hücreleri parçalamak için 250 mg asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak (500 ~ 700 µm) 5 dakika kuvvetlice vortekslenildi ardından çözünmeyen materyali çöktürmek için 2 dakika 18000 g'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısımdan 400 µl mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 400 µl %70 RNaz içermeyen etanol eklendi vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Daha sonra bir toplama tüpüne bir filtreli tüp yerleştirildi ve etanol eklenen numune karışımının tamamının bu tüpün içine aktarıldı ardından 30 saniye boyunca 18000 g'de santrifüjlendi. Tüpün dibindeki sıvı atıldı. Daha sonra örnekler yıkama solüsyonlarıyla yıkandı ve filtreli tüp bir elüsyon tüpüne yerleştirdi. Membran merkezine doğru 50 µl RNaz içermeyen distile su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika beklettikten sonra RNA'yı ayırtırmak için 18000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı UV-spektrofotometrede (Nano-Drop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen RNA'lar cDNA sentezi gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklandı.

cDNA Sentezi

İzolasyon işlemi sonucunda elde edilen tek sarmallı RNA'nın cDNA'ya transkripsiyonu OneScript® Plus cDNA Synthesis Kiti (ABM Good, Richmond, BC, Canada) kullanılarak yapıldı. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri RNase içermeyen bir ortamda bir araya getirildi. PCR için tasarlanmış temiz pipetörler ve aerosol dirençli pipet uçları kullanıldı. Soğutucu blok üzerine dizilen PCR tüplerinde her reaksiyon için 4 µl 5X RT Buffer, 1 µl dNTP, 1 µl random primerler, 1 µl OneScript® Plus RTase, 9 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Elde edilen cDNA sentez karışımına RNA izolasyon işleminden elde edilen 4 µl total RNA, RNaz içermeyen filtreli pipet ucu kullanılarak eklendi böylece son reaksiyon hacmi 20 µl olan cDNA sentez karışımı elde edildi. Daha sonra elde edilen reaksiyon vortekslenip ve kısaca santrifüjlendi. cDNA sentezi termal döngü cihazında (GeneAmp® PCR System 9700,

Applied Biosystems, ABD) 50°C’de 15 dakika inkübe ederek gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri soğutucu blok üzerine dizildi. cDNA örnekleri RT-PCR işlemi için -20°C’de saklandı.

Tablo 7. cDNA sentez karışımı içeriği

cDNA sentez karışımı	1x karışım (µl)
5X RT Buffer	4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Random primerler (10 µM)	1 µl
OneScript® Plus RTase	1 µl
İzole RNA	4 µl
RNaz içermeyen su	9 µl
Toplam Hacim	20 µl

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Real-Time PCR, floresan işaretli prob ve boyaların kullanılarak amplifikasyonun görünür hale geldiği bir yöntemdir. SYBR Green I sadece çift zincirli DNA’ya bağlanan floresan bir boyadır dolayısıyla amplifiye olan DNA miktarıyla orantılı olarak real-time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da artar. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında SYBR Green molekülü çift zincirli DNA’nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Bu nedenle PCR işleminin ilk kısmında sinyal zayıftır; amplifiye DNA miktarı arttıkça PCR cihazından izlenebilen floresan miktarı da artar. Ancak floresan açığa çıktığı her zaman hedef DNA’nın amplifiye olduğu anlamına gelmez. Bazen primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda oluşan primer dimerleri nedeniyle de floresan ışıma gözlenebilir. Bu durumda amplifiye olan DNA’nın hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA’ların erime eğrisi analizi (*melting curve*) yapılmalıdır. Erime eğrisi analizinde cihaz PCR ürünlerini yavaşça ısıtır ve böylece çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başlar ve floresan boya da serbest kalır. Her bir DNA’nın içerdiği GC/AT oranına bağlı olarak belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Primer dimerlerinin oluşması gibi spesifik olmayan ürünlerin reaksiyon sonucu oluşması durumunda DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır (55). Çalışmamızda, amplifiye olan DNA ürünlerinin hepsine erime eğrisi

analizi yapıldı ve nonspesifik amplifikasyon ürünlerinden kaynaklanan ışımlar tespit edilmesi durumunda bu örnekler için PCR işlemi tekrarlandı.

Amplifikasyon sırasında floresan miktarındaki artışın eşik değerinin aşıldığı ve PCR ürününde ilk anlamlı artışın olduğu döngü "eşik döngü değeri" (threshold cycle, Ct) olarak isimlendirilmektedir. Yani eşiğe ulaşmak için gereken döngü sayısına Ct değeri denir (56). Çakışma noktası (crossing point, Cp) ise amplifikasyon sırasında floresan sinyal artışının en yüksek olduğu nokta, yani amplifikasyonun logaritmik olarak lineerleştiği kısmın tam orta noktası olarak bilinmektedir. Roche LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) kullanım klavuzunda Cp değerinin Ct değeri ile eş anlamlı olduğu ve ölçümlerde Cp değeri kullanıldığı ifade edilmiştir. Çalışmamızda RT-PCR sonunda amplifikasyonların değerlendirilmesi için LightCycler® 480 System'in (Roche Molecular Systems, ABD) Abs Quant/Fit Points yazılımı kullanıldı.

oprD, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* genlerin ekspresyon düzeyi RT-PCR kullanılarak belirlendi. Ribozomal proteini kodlayan bir housekeeping gen olan *rpsL* geni, başlangıçtaki ürün miktarındaki farklılıklardan kaynaklanabilecek ölçüm farklılıklarını önlemek için ve hedef genlerin transkripsiyon seviyelerinin normalleştirilmesi için referans gen olarak kullanıldı. *oprD*, *rpsL* ve tüm efluks genlerinin amplifikasyonu iki defa yapıldı ve verilerin analizinde elde edilen Cp değerlerinin ortalaması kullanıldı.

PCR deneyleri +4°C'deki soğutucu bloklar üzerinde HibriGen 2X SYBR Green qPCR Mix (100 Mm KCl, 4 Mm MgCl₂, 400 µM dNTP, 0.1 U/µl Taq DNA Polimeraz, 1X SYBR Green ve diğer optimize tampon bileşenleri) kullanılarak çalışıldı. PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri daha önce yapılan çalışmalardan elde edildi. *oprD* geninin varlığı ve transkripsiyon ürün seviyesini tespit etmek için iki farklı primer çifti kullanıldı. Primer dizilimleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri ve referansları

Hedef Gen*	Primer Adı	Dizi (5'-3')	Amplikon Büyüklüğü(bp)	Referans
<i>oprD(A)</i>	oprD-F oprD-R	GCCGAAGCCGATATAATCAA CATCTACCGCACAAACGATG	157	(57)
<i>oprD(B)</i>	oprD-F2 oprD-R2	GCTCGACCTCGAGGCAGGCCA CCAGCGATTGGTCGGATGCCA	242	(30)
<i>mexB</i>	mexB-F mexB-R	GTGTTCTGGCTCGCAGTACTC AACCGTCGGGATTGACCTTG	244	(58)
<i>mexD</i>	mexD-F mexD-R	CTACCCTGGTGAAACAGC AGCAGGTACATCACCATCA	250	(59)
<i>mexF</i>	mexF-F mexF-R	CATCGAGATCTCCAACCT GTTCTCCACCACCACGAT	350	(59)
<i>mexY</i>	mexY-F mexY-R	CCGCTACAACGGCTATCCCT AGCGGGATCGACCAGCTTTC	250	(58)
<i>rpsL</i>	rpsL-F rpsL-R	GCAACTATCAACCGACTGGTG GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG	241	(60)

* Primer dizilimleri parantez içindeki ilgili referanslardan alınmıştır.

RT-PCR işlemi için gereken reaksiyon karışımı Tablo 9'da belirtilen şekilde hazırlandı.

oprD, *mexB*, *mexD*, *mexF* genlerinin PCR reaksiyonu için 10 µl HibriGen 2X SYBR Green qPCR Mix, 10 µM lık 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer içeren karışım hazırlandı ve üzerine 1 µl cDNA konularak son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde steril distile su eklendi.

rpsL geninin PCR reaksiyonu için 10 µl HibriGen 2X SYBR Green qPCR Mix, 10 µM lık 2 µl forward primer ve 1 µl reverse primer içeren karışım hazırlandı ve üzerine 1 µl cDNA konularak son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde steril distile su eklendi.

mexY geninin PCR reaksiyonu için ise HibriGen 2X SYBR Green qPCR Mix, 10 µM lık 0,5 µl forward primer ve 0,5 µl reverse primer içeren karışım hazırlandı ve üzerine 1 µl cDNA konularak son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde steril distile su eklendi.

Tablo 9. Bir örnek için RT-PCR reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon bileşeni	1x karışım (<i>oprD</i> (A-B), <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i>)	1x karışım (<i>rpsL</i>)	1x karışım (<i>mexY</i>)
2X SYBR Green qPCR Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl	2 µl	0,5 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl	1 µl	0,5 µl
cDNA	1 µl	1 µl	1 µl
Distile su	7 µl	6 µl	8 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl	20 µl	20 µl

LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) cihazı kullanılarak RT PCR işlemi gerçekleştirildi.

oprD (A, B), *mexB*, *mexD*, *mexF*, *rpsL* genlerinin 95°C’de 10 dakika başlangıç denatürasyonun ardından, 95°C/20 saniye denatürasyon, 52°C/10 saniye bağlanma ve 72°C/15 saniye uzama olarak 45 döngü boyunca RT-PCR işlemi uygulandı ve sonunda floresan ölçümü yapıldı. Ardından erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi. 95°C/0 saniye denatürasyonun ardından 65°C/15 saniye bağlanma gerçekleştirildi ve 95°C ye kadar ısıtma işlemi yapıldı. Cihaz tarafından her bir derece ısı artışında toplam beş defa floresan ölçümü yapıldı. Bu ölçümlerle ampikonun kendine özgü erime sıcaklığı (T_m derecesi) belirlendi.

mexY geni için; 95°C’de 10 dakika başlangıç denatürasyonun ardından, 95°C/20 saniye denatürasyon, 52°C/10 saniye bağlanma ve 72°C/15 saniye uzama olarak 45 döngü boyunca RT-PCR işlemi uygulandı ve sonunda floresan ölçümü yapıldı. Ardından erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi. 95°C/0 saniye denatürasyonun ardından 65°C/15 saniye bağlanma gerçekleştirildi ve 95°C ye kadar ısıtma işlemi

yapıldı. Her bir derece ısı artışında toplam beş defa floresan ölçümü yapıldı. Bu ölçümlerle ampikonun kendine özgü erime sıcaklığı belirlendi.

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenerek ampikonların doğruluğu görüldü. İçerisinde 0,5 µg/mL etidyum bromür olan %2'lik agaroz jel hazırlandı. İlk ve son kuyucuklara 100 bp adımlı DNA markerı (Softec, Türkiye), diğerlerine hedef ürünler yerleştirildi. İlk ve son kuyucuklara ise 3 µL 100 bp adımlı DNA marker yüklendi. Diğer kuyucuklara ise her bir tepkime tüpünden 5 µL alındı ve 1 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Örnekler önce 10 dakika boyunca 100 voltta yürütüldü, daha sonra 30 dakika boyunca 120 voltta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatörde incelendi. DNA markerın oluşturduğu bantlar ile PCR reaksiyonlarının oluşturduğu bantlar kıyaslanarak bantların beklenen PCR ürününe uygun olup olmadıkları değerlendirildi. Ardından Kodak Gel Logic 200 İmaging System (Kaliforniya, ABD) cihazında oluşan bantların fotoğrafı çekildi.

Ribozomal protein S12'yi kodlayan gen (*rpsL*), hedef genlerin transkripsiyon seviyelerini normalleştirmek için kullanıldı. Tüm genlerin normalleştirilmiş ifadesi, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Genlerin transkripsiyon düzeyleri *P. aeruginosa* PAO1 suşu kullanılarak değerlendirildi. İlgili her genin normalleştirilmiş ifadesi, PAO1 tarafından karşılık gelen mRNA ifadesi ile kıyaslandı.

PAO1 ile karşılaştırıldığında *oprD* geninin ekspresyon seviyesinin $\geq 30\%$ azalması *oprD* downregülasyonu için anlamlı kabul edildi. *mexD*, *mexF* ve *mexY* genlerinin ekspresyon seviyeleri PAO1 suşu ile kıyaslandığında 10 kat ve daha yüksek olması izolatlarda MexCD–OprJ, MexEF–OprN ve MexXY–OprM efluks pompalarının aşırı ekspresyonu olarak kabul edildi. *mexB* geni ekspresyon seviyesinin PAO1 suşundan 3 kat ve daha yüksek olması izolatta MexAB–OprM efluks pompasının aşırı ekspresyonu olarak kabul edildi (5, 61, 62).

3.4. Etik konular

Bu çalışma KTÜ-BAP tarafından desteklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bakteri İzolatlarının Birimlere ve Yıllara Göre Dağılımı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’da Ocak 2017- Ocak 2022 tarihleri arasında 16854 kan kültürü vasatındaki kan örneğinde bakteri üremesi tespit edilmiş olup bu örneklerin 872’sinde (%5,2) *P. aeruginosa* üremesi mevcuttu. Aynı hastadan tekrarlayan üremeler olduğunda sadece ilk izolat çalışmaya dahil edildiğinden toplamda 340 hastanın kan kültürü vasatındaki kan örneğinde *P. aeruginosa* üremesi olduğu belirlendi ve bu hastaların 64’ünde (%18,8) üretilen *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve/veya meropenem antibiyotiklerine dirençli olduğu tespit edildi. Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarı stoklarından yapılan pasajlarda üremesi tespit edilen 48 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edildi.

İmipenem ve/veya meropeneme dirençli 48 *P. aeruginosa* izolatının 5’i 2021, 10’u 2020, 11’i 2019, 12’si 2018, 10’u 2017 yılında laboratuvarımızda gönderilen kan örneklerinden izole edildi. Bu izolatların 25’i (%52,1) yoğun bakım ünitesinde, 19’u (%39,6) çeşitli dahili bölüm servislerinde, 4’ü (%8,3) cerrahi bölüm servislerinde takip edilen hastalara aitti (Tablo 10). Ayaktan tedavi ile takip edilen hastaların kan kültürlerinde karbapenem dirençli *P. aeruginosa* üremesi tespit edilmedi.

Tablo 10. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri birimlere ve yıllara göre dağılımı

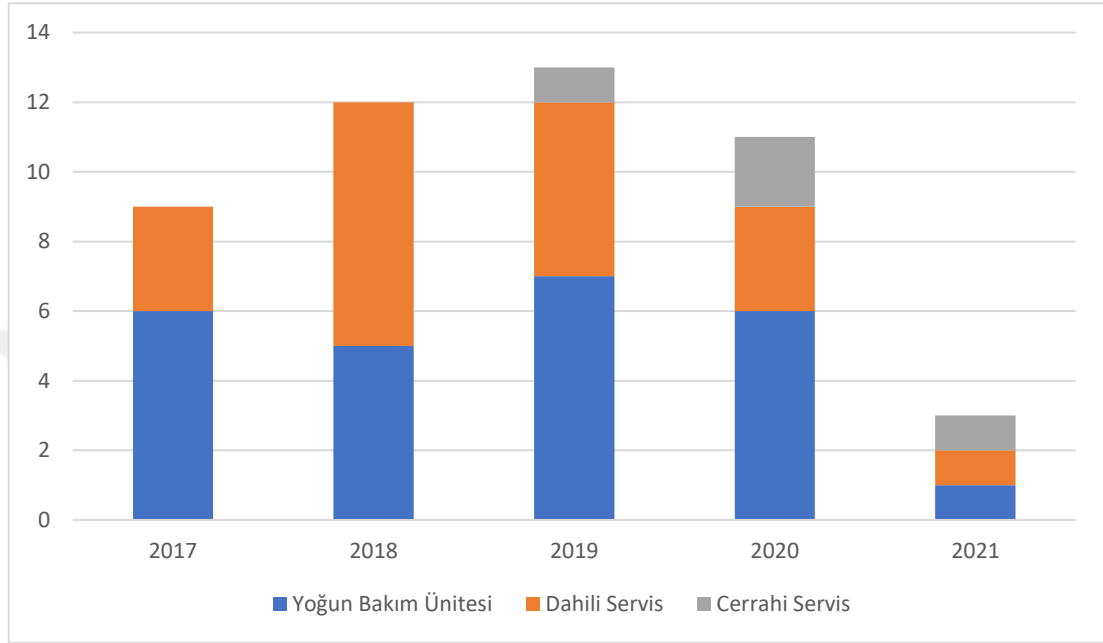
		2021	2020	2019	2018	2017	Toplam Sayı
Dahili Bölüm Servisleri	Acil servis	-	1	1	1	-	3
	Cildiye servisi	-	-	1	-	-	1
	Dahiliye Onkoloji Servisi	-	-	1	2	1	4

	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	-	1	1	-	-	2
	Kemik iliği transplantasyon servisi	-	-	-	1	-	1
	Pediyatri Enfeksiyon Servisi	-	-	-	1	-	1
	Pediyatri Hematoloji Servisi	-	-	-	1	-	1
	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi	-	-	-	-	1	1
	Yanık Ünitesi	1	1	1	1	1	5
	Toplam Sayı	1	3	5	7	3	19
Cerrahi Bölüm Servisleri	Üroloji Servisi	1	2	-	-	-	3
	Genel Cerrahi Servisi	-	-	1	-	-	1
	Toplam Sayı	1	2	1	-	-	4
Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)	Anestezi YBÜ	1	5	-	2	4	12
	Dahiliye YBÜ	-	1	-	-	2	3
	Kardiyovasküler Cerrahi YBÜ	-	-	1	-	-	1
	Nöroloji-Nöroşirurji YBÜ	-	-	4	2	-	6
	Pediyatri YBÜ	-	-	2	1	-	3
	Toplam Sayı	1	6	7	5	6	25

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

2021 yılına ait 3 izolatın, 1'i dahili serviste, 1'i cerrahi serviste, 1'si yoğun bakım ünitesinde; 2020 yılına ait 11 izolatın 3'ü dahili serviste, 2'si cerrahi serviste,

6'sı yoğun bakım ünitesinde, 2019 yılına ait 13 izolatın ise 5'i dahili serviste, 1'i cerrahi serviste 7'si yoğun bakım ünitesinde, 2018 yılına ait 12 izolatın ise 7'si dahili serviste, 5'i yoğun bakım ünitesinde, 2017 yılına ait 9 izolatın ise 3'ü dahili serviste, 6'sı yoğun bakım ünitesinde tedavi alan hastalardan izole edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. İzolatların yıllara ve gönderildiği birimlere göre dağılımı

4.2. Çalışma İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmadaki *P. aeruginosa* izolatların amikasin, sefepim, seftazidim, piperasilin/tazobaktam, siprofloksasin antimikrobiyalleri için BD Phoenix™ otomatize sistemi ile belirlenen antimikrobiyal MİK değerleri Tablo 11'de belirtildi. Belirlenen antimikrobiyal MİK değerleri EUCAST sınır değerlerine göre yorumlandığında çalışmadaki izolatlarda, amikasin 9'unda (%18,8) dirençli, 39'unda (%81,2) duyarlı; sefepim 23'ünde (%47,9) dirençli, 25'inde (%52,1) yüksek dozda duyarlı; seftazidim 22'sinde (%45,8) dirençli, 26'sında (%54,2) yüksek dozda duyarlı; piperasilin/tazobaktam 22'sinde (%45,8) dirençli, 26'sında (%54,2) yüksek dozda duyarlı; siprofloksasin 22'sinde (%45,8) dirençli, 27'sinde (%54,2) yüksek dozda duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik MİK değerleri ve duyarlılık kategorileri

İZOLAT NO	OTOMATİZE SİSTEM SONUCU										SIVI MİKRODİLÜSYON TESTİ SONUCU							
	AK		FEP		CAZ		CIP		TZP		CO		MEM		IMI		DOR	
PA1	32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	1	S	128	R	256	R	256	R
PA2	≤8	S	2	I	4	I	≤0.125	I	≤4	I	0.5	S	128	R	256	R	8	R
PA3	≤8	S	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	2	S	128	R	32	R	64	R
PA4	≤4	S	8	I	8	I	1	R	16	I	<0.125	S	128	R	32	R	8	R
PA5	>32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	2	S	64	R	32	R	64	R
PA6	>16	R	>8	R	>8	R	>2	R	>16	R	<0.125	S	32	R	64	R	16	R
PA7	≤8	S	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	8	R	256	R	>256	R	256	R
PA8	≤4	S	4	I	4	I	2	R	16	I	0.25	S	128	R	256	R	128	R
PA9	≤4	S	>8	R	>8	R	0.25	I	>16	R	4	S	128	R	256	R	128	R
PA10	≤4	S	4	I	4	I	0,25	I	8	I	4	S	128	R	256	R	128	R
PA11	≤4	S	>8	R	>8	R	≤0.125	I	>16	R	2	S	128	R	16	R	32	R
PA12	≤4	S	8	I	4	I	0.5	I	16	I	4	S	8	I	8	R	8	R
PA13	>32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	1	S	64	R	256	R	64	R
PA14	≤4	S	8	I	4	I	0.5	I	16	I	8	R	32	R	128	R	4	R
PA15	>32	R	>8	R	8	I	>1	R	>16	R	2	S	32	R	64	R	32	R
PA16	≤4	S	8	I	8	I	0,25	I	16	I	1	S	32	R	16	R	8	R
PA17	≤8	S	2	I	2	I	>1	R	≤4	I	0.25	S	32	R	128	R	16	R
PA18	≤4	S	2	I	2	I	≤0.125	I	≤4	I	1	S	32	R	32	R	32	R
PA19	≤8	S	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	0.125	S	16	R	128	R	8	R
PA20	≤8	S	4	I	8	I	>1	R	16	I	1	S	128	R	32	R	8	R
PA21	≤8	S	>8	R	>8	R	0,25	I	>16	R	1	S	16	R	32	R	16	R
PA22	≤4	S	2	I	4	I	0.25	I	8	I	2	S	8	I	16	R	8	R
PA23	≤8	S	8	I	8	I	1	R	16	I	0,5	S	8	I	64	R	8	R
PA24	≤4	S	4	I	4	I	≤0.125	I	≤4	I	2	S	2	S	32	R	4	R

İZOLAT NO	OTOMATİZE SİSTEM SONUCU										SIVI MİKRODİLÜSYON TESTİ SONUCU							
	AK		FEP		CAZ		CIP		TZP		CO		MEM		IMI		DOR	
PA25	<=4	S	8	I	>8	R	<=0.125	I	8	I	1	S	8	I	16	R	8	R
PA26	<=4	S	2	I	2	I	<=0.125	I	<=4	I	1	S	2	S	16	R	4	R
PA27	32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	0.125	S	2	S	32	R	2	I
PA28	<=8	S	>8	R	>8	R	0,5	I	>16	R	1	S	8	I	16	R	16	R
PA29	<=4	S	2	I	2	I	<=0.125	I	<=4	I	1	S	8	I	16	R	8	R
PA30	>32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	2	S	64	R	256	R	64	R
PA31	32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	0.125	S	128	R	256	R	128	R
PA32	<=8	S	>8	R	8	I	1	R	16	I	1	S	128	R	256	R	64	R
PA33	<=4	S	8	I	>8	R	0,5	I	>16	R	0.25	S	64	R	256	R	64	R
PA34	<=4	S	<=1	I	2	I	<=0.125	I	<=4	I	1	S	64	R	16	R	64	R
PA35	<=8	S	<=1	I	2	I	0.25	I	<=4	I	0,5	S	8	I	16	R	8	R
PA36	<=8	S	4	I	4	I	<=0.125	I	8	I	0.125	S	16	R	256	R	8	R
PA37	<=8	S	<=1	I	2	I	<=0.0625	I	<=4	I	1	S	8	I	128	R	4	R
PA38	<=8	S	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	4	S	256	R	>256	R	256	R
PA39	<=4	S	2	I	2	I	0.25	I	<=4	I	2	S	128	R	256	R	128	R
PA40	>32	R	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	0.125	S	128	R	256	R	256	R
PA41	<=4	S	>8	R	>8	R	<=0.125	I	>16	R	1	S	128	R	256	R	64	R
PA42	<=4	S	4	I	2	I	<=0.125	I	<=4	I	1	S	128	R	16	R	64	R
PA43	<=8	S	>8	R	>8	R	>1	R	>16	R	0.125	S	64	R	64	R	16	R
PA44	<=8	S	2	I	2	I	0.5	I	<=4	I	2	S	64	R	16	R	4	R
PA45	<=8	S	2	I	4	I	<=0.125	I	<=4	I	1	S	16	R	64	R	8	R
PA46	<=8	S	>8	R	8	I	1	R	16	I	0.125	S	128	R	256	R	4	R
PA47	<=8	S	>8	R	>8	R	0.25	I	>16	R	1	S	8	I	64	R	8	R
PA48	<=8	S	>8	R	>8	R	>2	R	>16	R	2	S	16	R	256	R	16	R

S: Duyarlı, I: Yüksek dozda duyarlı, R: Dirençli, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, DOR: Doripenem, CO: Kolistin

Sıvı mikrodilüsyon testlerinde, testin kendi içindeki pozitif kontrolü olan pleytin 11. kuyucuğunda üreme oldu ve testin kendi içindeki negatif kontrolü olan pleytin 12. kuyucuğunda ise üreme olmadı. Ayrıca mikrodilüsyon testlerinde kontrol olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşlarında antibiyotik MİK değerleri beklenen sınır değerler aralığında tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen klinik izolatların karbapenem MİK değerleri tespit edildi ve EUCAST kriterlerine göre duyarlı, yüksek dozda duyarlı ve dirençli olarak yorumlandı.

Tüm izolatlarda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen kolistin, meropenem, imipenem ve doripenem MİK değerleri Tablo 11’de belirtildi. Çalışmadaki izolatlarında, meropenem 36’inde (%75) dirençli, 9’unda (%18,8) yüksek dozda duyarlı, 3’ünde (%6,2) duyarlı; imipenem tamamında (%100) dirençli; doripenem 47’sinde (%97,9) dirençli, 1’inde (%2,1) yüksek dozda duyarlı; kolistin 2’sinde (%4,2) dirençli 46’sında (%95,8) duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 12). İzolatların 36’sı (%75) üç karbapeneme de dirençliydi. Bu çalışmada izolatların çoğunda karbapenemlere karşı yüksek MİK değerleri mevcuttu. Karbapenemler arasında direnç oranı en fazla olan imipenemdi. Suşların tamamı imipeneme karşı dirençliydi. Karbapenemler arasında duyarlılık oranı en yüksek olan ise meropenemdi. İzolatların %18,8’i meropeneme karşı yüksek dozda duyarlıydı. Suşlarının sadece birisi doripenem’e karşı yüksek dozda duyarlıydı. Diğer tüm *P. aeruginosa* suşları doripenem’e karşı dirençliydi. Genel olarak doripenem MİK değerlerinin imipenem ve meropenem MİK değerlerinden daha düşük olduğu tespit edildi ancak bu durum direnç kategorizasyonunu etkilemedi.

Bu çalışmada karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında duyarlılık oranı en fazla olan antibiyotiğin kolistin, ikinci sırada ise amikasin olduğu belirlenmiştir. Çalışma izolatlarının yarısından fazlasının sefepim, seftazidim, siprofloksasin ve piperasilin/tazobaktam için yüksek dozda duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 12). Bu çalışmada 24 izolatın (%50) en az üç ve daha fazla antibiyotik grubundan birer antibiyotiğe direnç gösterdiği yani çok ilaca dirençli olduğu saptanmıştır.

Tablo 12. *P. aeruginosa* izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara duyarlılık kategorileri

Antimikrobiyal ajan	S (%)	I (%)	R (%)
İmipenem	0	0	100
Meropenem	6,2	18,8	75
Doripenem	0	2,1	97,9
Amikasin	81,2	0	18,8
Sefepim	0	52,1	47,9
Seftazidim	0	54,2	45,8
Siprofloksasin	0	54,2	45,8
Piperasilin/tazobaktam	0	54,2	45,8
Kolistin	95,8	0	4,2

S: Duyarlı, I: Yüksek dozda duyarlı, R: Dirençli

İzolatların sırasıyla %50 ve %90'ının üremesinin inhibe edildiği en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri karbapenem grubu antibiyotikler ve kolistin için Tablo 13'de belirtildi. Üç karbapenem grubu antibiyotik içinden imipenemin MİK₉₀ değeri 256 µg/ml iken, meropenemin ve doripenemin MİK₉₀ değeri 128 µg/ml idi. Doripenemin MİK₅₀ değeri (16 µg/ml) ise hem imipenem (64 µg/ml) hem de meropenemin (64 µg/ml) MİK₅₀ değerinden daha düşüktü.

Tablo 13. *P. aeruginosa* izolatlarının MİK dağılımı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

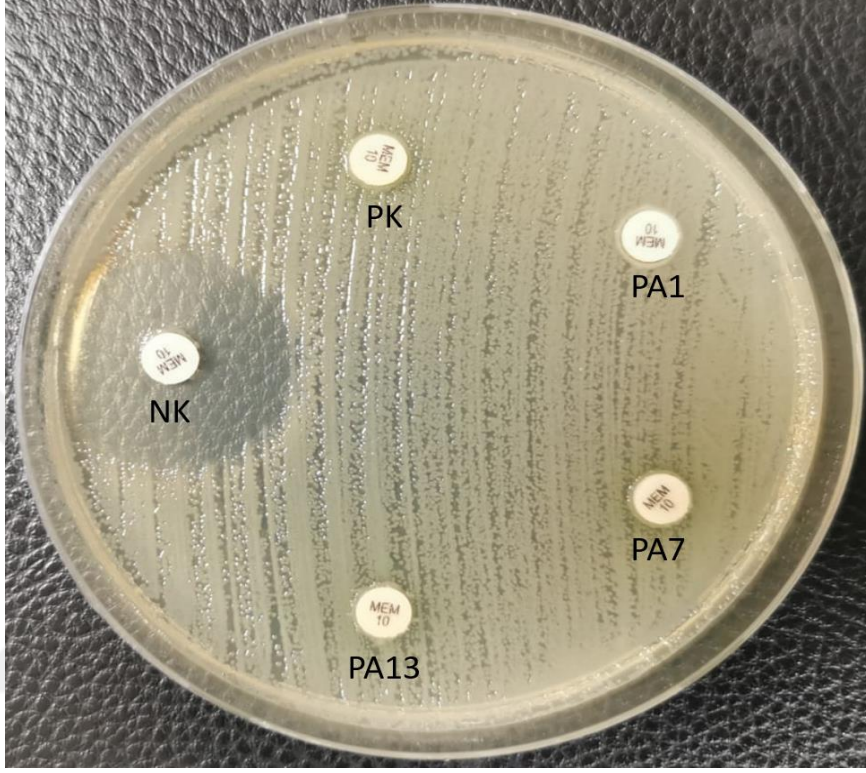
Antimikrobiyal ajan	MİK dağılımı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
IMP	8->256	64	256
MEM	2-256	64	128
DOR	2-256	16	128
CO	<0,125-8	1	4

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, DOR: Doripenem, CO: Kolistin

4.3. Karbapenemaz Varlığının Fenotipik Olarak Araştırılması

Karbapenemaz varlığının araştırılmasında fenotipik tarama testi olarak kullanılan CIM testi sonucunda 48 *P. aeruginosa* izolatının 7'sinde (%14,6)

karbapenemaz üretimi tespiti edildi. Şekil 4’de görüldüğü gibi PA1, PA7 ve PA13 suşlarında pozitif kontrole benzer şekilde inhibisyon zonu görülmedi ve karbapenemaz üretimi tespiti edildi şeklinde yorumlandı. Negatif kontrolde ise belirgin bir inhibisyon zonu görüldü.

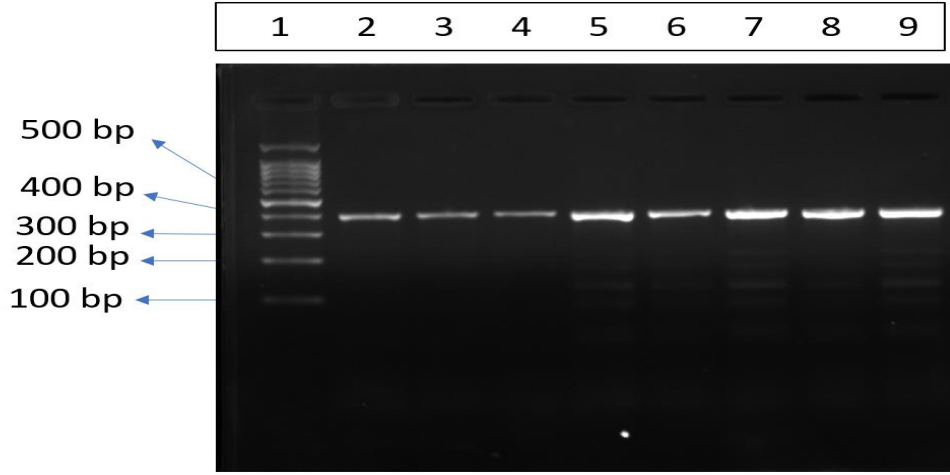


Şekil 4. Karbapenemaz varlığının fenotipik olarak ‘Karbapenemaz İnaktivasyon Metodu’ (CIM) ile araştırılması

PK, Pozitif kontrol; NK, Negatif kontrol

4.4. Karbapenemaz Varlığının Genotipik Olarak Araştırılması

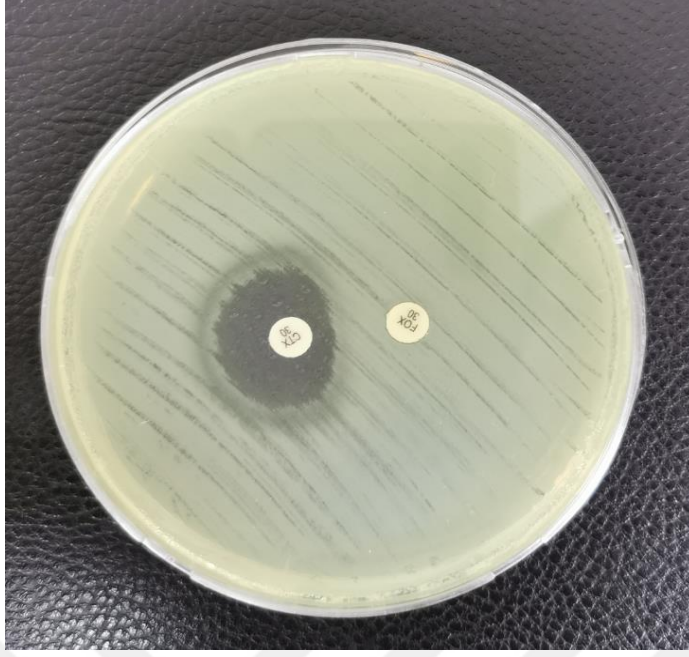
Fenotipik olarak karbapenemaz tespit edilen 7 *P. aeruginosa* izolatında, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* ve *bla_{OXA-48}* genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR işleminde izolatların tümünde 390 bp büyüklüğünde *bla_{VIM}* geni ile uyumlu PCR ürünü tespit edildi (Şekil 5). *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* ve *bla_{OXA-48}* gen bölgeleri ile uyumlu amplifikasyon ürünleri saptanmadı.



Şekil 5. VIM primerleri ile PCR işlemi sonrasında elde edilen ampikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA marker, 2: VIM Pozitif kontrol, 3: PA1, 4: PA7, 5: PA13, 6: PA30, 7: PA31, 8: PA38, 9: PA40)

4.5. AmpC Aracılı Direncinin Fenotipik Olarak Saptanması

İndüklenebilir AmpC β -laktamazların saptanması için yapılan disk antagonizm testi sonucunda 48 *P. aeruginosa* izolatının 23'ünde (%47,9) sefotaksim diski inhibisyon zon bölgesinin Sefoksitin diskine bakan tarafta belirgin şekilde daraldığı görüldü ve indüklenebilir AmpC β -laktamaz tespit edildi şeklinde yorumlandı. Çalışmadaki izolatların 25'inde (%52,1) ise sefotaksim diski inhibisyon zon bölgesinde belirgin bir daralma gözlenmedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunda da indüklenebilir AmpC β -laktamaz varlığı doğrulandı.



Şekil 6. Disk antagonizm testi ile indüklenebilir AmpC β -laktamaz üretiminin gösterilmesi

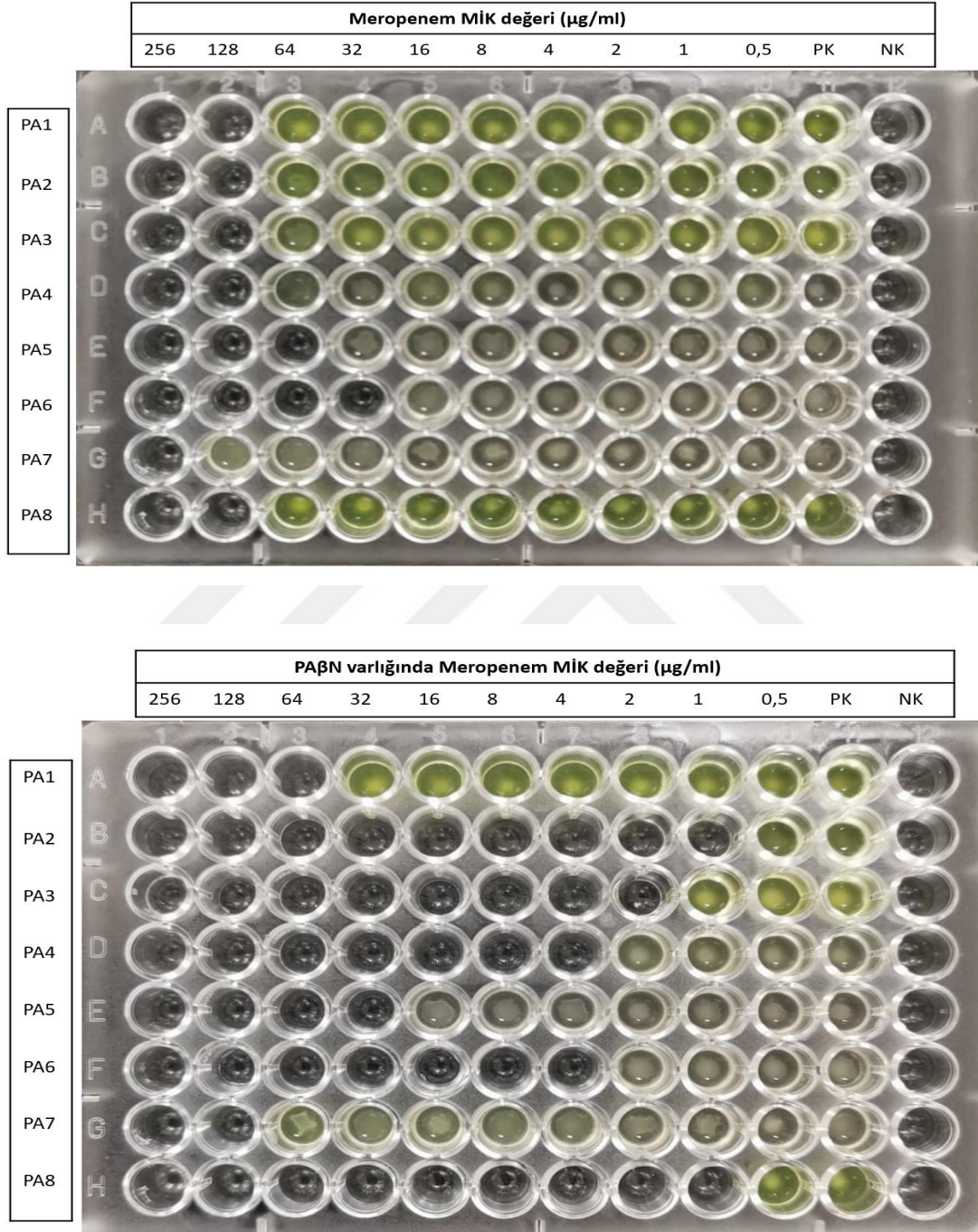
FOX, sefoksitin; CTX, sefotaksim

4.6. Efluks Pompası Aktivitesi Artışının Fenotipik Analizi

Efluks pompasının aşırı üretiminin fenotipik olarak tespiti için, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile efluks pompa inhibitörü (PA β N) içeren ve içermeyen MHB besiyerinde *P. aeruginosa* izolatlarının meropenem antibiyotiğine karşı MİK değerleri eş zamanlı olarak tespit edildi. PA β N varlığında meropenem MİK'lerinde dört kat veya daha fazla azalma efluks pompasının varlığı olarak kabul edildi. Bakterilerin meropenem olmadan tek başına akış pompası inhibitörü ile test edildiğinde ise PA β N'nin bakteri üremesi üzerinde hiçbir etki göstermediği görüldü.

Tüm testlerde, testin kendi içindeki pozitif kontrolü olan pleytin 11. kuyucunda üreme oldu ve testin kendi içindeki negatif kontrolü olan pleytin 12. kuyucunda ise üreme olmadı. Şekil 8'de bazı *P. aeruginosa* suşlarının PA β N içeren ve içermeyen MHB besiyerinde meropenem sıvı mikrodilüsyon testine ait pleyt görüntüleri verilmiştir. Çalışmada, inhibitör varlığında meropenem MİK değerlerinin dört kat veya daha fazla azalması efluks pompasının aşırı ekspresyonu olarak kabul

edildiğinden Şekil 8’de PA2, PA3, PA4, PA6, PA8 suşlarının PAβN eklenmesiyle meropenem MİK değerlerindeki anlamlı düşüş görülmektedir.



Şekil 7. Çalışmadaki bazı *P. aeruginosa* suşlarının PAβN içeren ve içermeyen MHB besiyerinde meropenem sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları.

Tüm izolatlarının PA β N yokluğunda ve varlığında meropenem MİK değerleri Tablo 14’de belirtilmiştir. Bu çalışmadaki 48 izolattan 35’inde (%72,9) PA β N varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azaldı dolayısıyla efluks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edildi. PA β N varlığında bu 35 izolatın 34’ünde Meropenemin MİK seviyeleri duyarlı veya yüksek dozda duyarlı seviyelerine düşmüştür. Sadece bir izolatta PA β N varlığında meropenem aktivitesinin geri dönmesi görülmemiştir. Bu izolat VIM üretimi olan bir izolattır. İzolatların 13’ünde (%27,1) ise MİK değeri değişmedi ya da 4 kattan daha az oranda azaldı.

Tablo 14. *P. aeruginosa* izolatlarının PA β N yokluğunda ve varlığında meropenem MİK değerleri

İzolat no	Meropenem MİK(μ g/ml)	Meropenem+ PA β N MİK(μ g/ml)
PA1	128	64
PA2	128	1
PA3	128	2
PA4	128	4
PA5	64	32
PA6	32	4
PA7	256	128
PA8	128	1
PA9	128	2
PA10	128	4
PA11	128	4
PA12	8	8
PA13	64	16
PA14	32	8
PA15	32	8
PA16	32	4
PA17	32	2
PA18	32	4
PA19	16	4
PA20	128	4
PA21	16	2
PA22	8	2
PA23	8	2
PA24	2	2
PA25	8	2
PA26	2	2

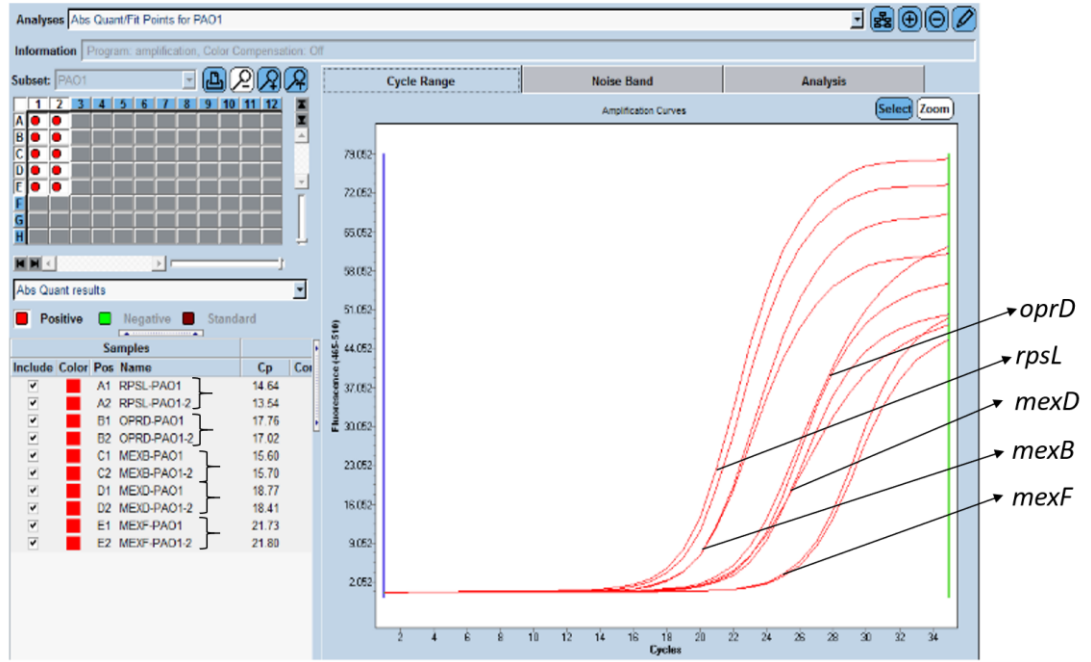
PA27	2	2
PA28	8	2
PA29	8	1
PA30	64	32
PA31	128	64
PA32	128	8
PA33	64	1
PA34	64	2
PA35	8	4
PA36	16	2
PA37	8	0,5
PA38	256	128
PA39	128	1
PA40	128	128
PA41	128	2
PA42	128	4
PA43	64	16
PA44	64	64
PA45	16	0,5
PA46	128	4
PA47	8	2
PA48	16	4

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

4.7. Eflüks Pompası Genlerinin ve Porin Proteini Geninin Transkripsiyon Seviyelerinin Araştırılması

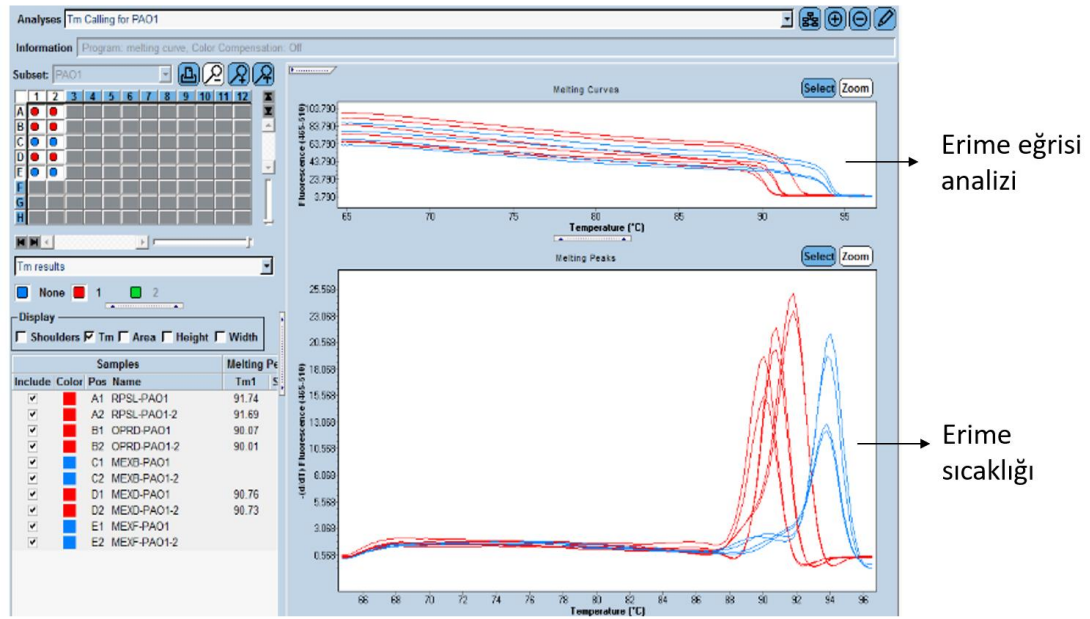
Çalışmaya alınan tüm izolatlarda *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *oprD* gen amplifikasyonları ve kontrol olarak kullanılan *rpsL* gen amplifikasyonları RT-PCR yöntemiyle belirlendi. Elde edilen amplifikasyonlar LightCycler® 480 System'in (Roche Molecular Systems, ABD) Abs Quant/Fit Points yazılımı kullanılarak değerlendirildi. RT-PCR işlemi her örnek için ayrı ayrı ikişer kez gerçekleştirildi. İki deneyde elde edilen mRNA seviyelerinin ortalama değerleri dikkate alındı.

SYBR Green I boyasının sentezlenen DNA'ya bağlanmasıyla oluşan floresans değerlerinin ölçümüyle oluşan amplifikasyon eğrileri ve amplifikasyonun logaritmik olarak lineerleştiği kısmın tam orta noktası olan Cp değerlerinin bir örneği Şekil 8'de gösterilmiştir.



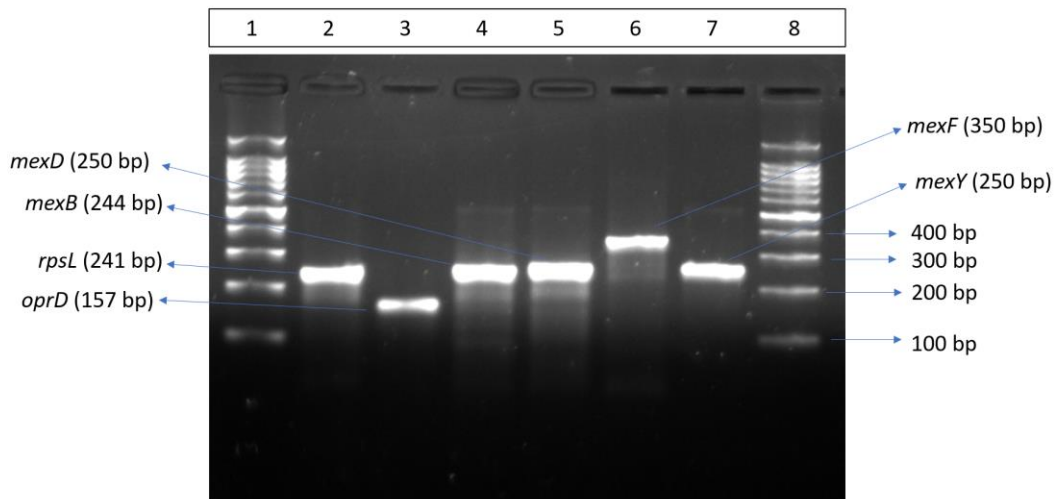
Şekil 8. PAO1 susuna ait iki farklı örnekte test edilen *oprD*, *rpsL*, *mexB*, *mexD* ve *mexF*'nin RT-PCR işlemi sonucunda oluşan amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri

Çalışmada RT-PCR ile sadece hedeflenen PCR ürünlerinin amplifiye olduğunu göstermek amacıyla erime eğrisi analizi yapıldı. Özgül olmayan PCR ürünleri erime eğrisi analizinde birden fazla erime derecesinde pik oluştuğu görülmesi beklenirdi. Ancak tüm örneklerin erime eğrisi analizi sonucunda her gen için aynı erime sıcaklığında tek bir erime piki izlendi (Şekil 9). Böylece RT-PCR işleminde her bir gen için sadece bir ampikon meydana geldiği ve bu ampikonun özgül olduğu saptandı.



Şekil 9. PAO1 susuna ait iki farklı örnekte test edilen *oprD*, *rpsL*, *mexB*, *mexD* ve *mexF*'nin RT-PCR işlemi sonrası erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi

Çalışmada ayrıca amplifikasyon sonucunda oluşan ürününün hedeflenen baz uzunluğunda olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde incelenerek ampliconların doğruluğu tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 10. RT-PCR işlemi sonrasında elde edilen ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsü (1 ve 8: DNA marker, 2: *rpsL*, 3: *oprD*, 4: *mexB*, 5: *mexD*, 6: *mexF*, 7: *mexY*)

mexD, *mexF* veya *mexY* genleri için referans suş PAO1 ile kıyaslandığında izolatların mRNA düzeyinde 10 katlık artış bu genlerin aşırı ekspresyonu olarak, 5-10 katlık artış genlerin sınırdaki ekspresyonu olarak değerlendirildi. *mexB* geni için referans suş PAO1 ile kıyaslandığında izolatların mRNA düzeyindeki 3 katlık artış bu gendeki aşırı ekspresyon olarak, 2-3 katlık artış ise sınırdaki ekspresyon olarak kabul edildi. İzolatlarda tespit edilen *oprD* miktarında referans suş PAO1 ile kıyaslandığında %30 ve üzeri azalma ise *oprD* downregülasyonu olarak yorumlandı.

oprD, *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY* gen bölgelerinin qPCR yöntemiyle belirlenen göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin PAO1'e göre katları Tablo 15'te gösterilmiştir.

Mevcut primerler ile ilgili genler araştırılırken bazı suşlarda bazı genler tespit edilemedi. Tablo 15'te görüldüğü gibi *mexF* geni 2 suшта, *mexY* geni ise 1 suшта mevcut primerler ile tespit edilemedi.

oprD(B) primeri ile yapılan amplifikasyon işlemlerinde herhangi bir amplifikasyon eğrisi elde edilemedi. *oprD(A)* primeri ile ise sadece 14 izolatta amplifikasyon gerçekleşti. Mevcut primer ile diğer 34 suшта ait amplifikasyon gerçekleştirilemedi.

Tablo 15. *P. aeruginosa* izolatlarının PAO1 suşuna kıyasla efluks ve porin genlerin göreceli ekspresyon seviyeleri

İzolat no	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>	<i>oprD</i>
PAO1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PA1	1,63	3,27	4,5	21,00	-
PA2	2,21*	1,82	4,5	15,00	-
PA3	1,79	1,95	2,75	18,00	1,05
PA4	1,83	2,61	3,75	25,00	-
PA5	1,65	1,39	-	5,00*	1,98
PA6	2,58*	7,59*	22,5	99,50	-
PA7	1,52	3,50	3,50	16,00	-
PA8	1,62	3,50	3,00	41,00	-
PA9	2,14*	3,32	7,50*	125,00	-
PA10	2,53*	3,61	4,25	27,50	-
PA11	1,85	1,81	4,50	16,00	-
PA12	1,90	1,70	2,00	7,50*	0,79

PA13	2,36*	1,82	5,00*	11,00	4,00
PA14	2,21*	2,73	3,75	12,50	2,21
PA15	1,91	4,45	7,00*	27,00	-
PA16	1,92	3,18	6,25*	15,00	3,56
PA17	3,01	2,04	5,25*	15,00	1,23
PA18	2,27*	2,02	3,75	9,00*	1,16
PA19	3,02	5,11*	14,25	35,00	-
PA20	1,85	4,57	10,00	51,50	-
PA21	1,68	2,23	4,50	9,50*	-
PA22	2,53*	1,59	4,50	8,50*	3,13
PA23	1,87	3,41	7,25*	31,50	-
PA24	1,88	1,93	2,25	6,50*	1,75
PA25	1,72	2,02	2,00	15,50	-
PA26	1,55	1,52	2,00	9,00*	-
PA27	1,77	1,25	3,25	1,50	-
PA28	1,88	28,16	1101,75	572,00	-
PA29	2,06*	6,89*	10,75	38,50	-
PA30	2,27*	2,98	5,75*	33,00	3,97
PA31	2,10*	2,05	2,25	14,00	-
PA32	1,36	2,95	4,25	29,00	-
PA33	3,47	8,39*	3,75	97,50	1,46
PA34	2,46*	1,68	2,00	12,00	1,44
PA35	0,08	1,32	-	-	-
PA36	1,75	3,07	2,25	22,50	-
PA37	1,34	1,14	1,00	10,50	-
PA38	0,26	1,02	1,00	6,50*	-
PA39	2,18*	2,05	1,75	17,00	-
PA40	2,36*	3,02	3,75	27,00	-
PA41	1,94	2,75	4,50	19,00	-
PA42	2,36*	1,68	0,95	4,00	-
PA43	1,85	2,84	3,25	21,00	2,04
PA44	1,09	1,48	1,50	5,00*	-
PA45	2,60*	1,93	4,50	14,50	-
PA46	3,01	3,59	6,00*	34,30	-
PA47	1,92	1,64	2,50	10,00	-
PA48	3,07	1,98	2,50	28,50	-

Kalın yazılar efluks pompasının aşırı ekspresyonunu gösterir; (*) sınırda ekspresyonu gösterir; (-): tespit edilemedi

Çalışmadaki 48 *P. aeruginosa* izolatının tümünde *mexB* geni tespit edildi. İzolatların 5'inde (%10,5) *mexB* geninin aşırı ekspresyonu belirlendi. 16 izolatta ise *mexB* geninin sınırda ekspresyonu belirlendi. Kalan yirmi yedi izolatta ise *mexB* geninin aşırı ekspresyonu görülmedi.

mexD geni *P. aeruginosa* izolatının tümünde tespit edildi. İzolatların sadece birinde (%2) *mexD* geninin aşırı ekspresyonu belirlendi. Dört izolatta ise *mexD* geninin sınırdaki ekspresyonu belirlendi. Kalan kırküç izolatta ise *mexB* geninin aşırı ekspresyonu görülmedi.

mexF geni izolatların sadece ikisinde tespit edilemedi. İzolatların 5'inde (%10,5) *mexF* geninin aşırı ekspresyonu belirlendi. Sekiz izolatta ise *mexF* geninin sınırdaki ekspresyonu belirlendi. Kalan otuzüç izolatta ise *mexF* geninin aşırı ekspresyonu görülmedi.

mexY geni *P. aeruginosa* izolatlarının sadece birinde tespit edilemedi. İzolatların 36'sında (%75) *mexY* geninin aşırı ekspresyonu belirlendi. Dokuz izolatta ise *mexY* geninin sınırdaki ekspresyonu belirlendi. İzolatların sadece ikisinde *mexY* geninin aşırı ekspresyonu görülmedi. Böylece *mexY*'nin tüm izolatlarda en fazla ekspresyonu olan eflüks pompası geni olduğu tespit edildi.

Sadece 14 izolatta *oprD* miktarı tespit edildi. Bu izolatlardan sadece birisinde referans suş PAO1'e göre *oprD* miktarında azalma saptandı ancak bu azalma anlamlı değildi. Bu çalışmada referans suş PAO1 ile kıyaslandığında *oprD* miktarında %30 ve üzeri azalma hiçbir izolatta saptanmadı.

Karbapenem dirençli 48 *P. aeruginosa* izolatında *oprD* downregülasyonu, AmpC beta-laktamazın aşırı üretimi, eflüks pompa genlerinin aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz enzimlerinin üretimi olmak üzere dört farklı karbapenem direnç mekanizması araştırıldı ve izolatlarda tespit edilen direnç mekanizmaları Tablo 16'da belirtildi.

Tablo 16. *P. aeruginosa* izolatlarında farklı karbapenem direnç mekanizmalarının tespiti

İzolat no	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>	<i>oprD</i>	Fenotipik eflüks pompası tespiti	Karbapenemaz geni	AmpC aşırı üretimi
PA1	-	-	-	+	TE	-	<i>bla_{VIM}</i>	-
PA2	*	-	-	+	TE	+		+
PA3	-	-	-	+	-	+		+
PA4	-	-	-	+	TE	+		+

PA5	-	-	TE	*	-	-	-
PA6	*	*	+	+	TE	+	-
PA7	-	-	-	+	TE	-	<i>bla</i> _{VIM}
PA8	-	-	-	+	TE	+	+
PA9	*	-	*	+	TE	+	-
PA10	*	-	-	+	TE	+	+
PA11	-	-	-	+	TE	+	-
PA12	-	-	-	*	-	-	+
PA13	*	-	*	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM}
PA14	*	-	-	+	-	+	-
PA15	-	-	*	+	TE	+	-
PA16	-	-	*	+	-	+	+
PA17	+	-	*	+	-	+	+
PA18	*	-	-	*	-	+	+
PA19	+	*	+	+	TE	+	-
PA20	-	-	+	+	TE	+	-
PA21	-	-	-	*	TE	+	-
PA22	*	-	-	*	-	+	+
PA23	-	-	*	+	TE	+	-
PA24	-	-	-	*	-	-	+
PA25	-	-	-	+	TE	+	-
PA26	-	-	-	*	TE	-	+
PA27	-	-	-	-	TE	-	+
PA28	-	+	+	+	TE	+	-
PA29	*	*	+	+	TE	+	+
PA30	*	-	*	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PA31	*	-	-	+	TE	-	<i>bla</i> _{VIM}
PA32	-	-	-	+	TE	+	-
PA33	+	*	-	+	-	+	-
PA34	*	-	-	+	-	+	+
PA35	-	-	TE	TE	TE	-	+
PA36	-	-	-	+	TE	+	+
PA37	-	-	-	+	TE	+	+
PA38	-	-	-	*	TE	-	<i>bla</i> _{VIM}
PA39	*	-	-	+	TE	+	+
PA40	*	-	-	+	TE	-	<i>bla</i> _{VIM}
PA41	-	-	-	+	TE	+	-
PA42	*	-	-	-	TE	+	+
PA43	-	-	-	+	-	+	-
PA44	-	-	-	*	TE	-	+

PA45	*	-	-	+	TE	+	+
PA46	+	-	*	+	TE	+	+
PA47	-	-	-	+	TE	+	-
PA48	+	-	-	+	TE	+	-
n(sayı)	5	1	5	36	0	35	7
%	%10,5	%2	%10,5	%75		%72,9	%14,6
							%47,9

(+) Pozitif sonuç; (-) Negatif sonuç; (*) Sınırdaki ekspresyon; (TE) Tespit edilemedi

Çalışma izolatlarının 47'sinde en az bir direnç mekanizması tespit edildi. En sık tespit edilen direnç mekanizması eflüks pompası aktivitesinin aşırı artmasıydı. Bu çalışmadaki 48 izolattan 35'inde (%72,9) PAβN varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azaldı dolayısıyla eflüks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edildi. Fenotipik olarak eflüks pompası tespit edilen ancak moleküler olarak *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY*'nin aşırı ekspresyonu tespit edilmeyen ise 4 izolat belirlendi. Bu izolatların tamamında en az bir eflüks pompasının sınırdaki ekspresyonu mevcuttu. Aynı zamanda bu 4 izolatın 3'ünde ek olarak AmpC beta-laktamazın aşırı üretimi de tespit edildi (Tablo 16). PAβN varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azalmayan 13 izolat mevcuttu. Bu izolatların 5'inde eflüks pompa geni RT-PCR ile tespit edildi ancak bu izolatlar aynı zamanda karbapenemaz üreten izolatlardı ve fenotipik testte MİK düşüşü izlenemedi.

İzolatların 36'sında (%75) eflüks pompa genlerinin aşırı ekspresyonu tespit edildi. Moleküler yöntemler ile eflüks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edilen 36 izolattın 5'sinde PAβN ile kombinasyon halinde meropenem MİK'inde anlamlı bir düşüş tespit edilmedi. Ancak bu 5 izolatın karbapenemaz üretimi olan izolatlar olduğu belirlendi. Moleküler yöntemle eflüks pompası geni saptanamayan 12 izolattın 4'ünde fenotipik olarak eflüks pompası tespit edildi. 31 izolatta ise hem RT-PCR ile eflüks pompası genlerinden bir veya daha fazlasının aşırı ekspresyonu ve PAβN ile kombinasyon halinde meropenem MİK'inde anlamlı bir azalma saptandı.

Moleküler yöntemler ile izolatların 36'sında (%75) *mexY*, 5'inde (%10,5) *mexB*, 5'inde(%10,5) *mexF* ve 1'inde (%2) *mexD* eflüks pompası geni aşırı ekspresyonu tespit edildi. *mexB*, *mexD* ve *mexF* aşırı ekspresyonuna sahip tüm

izolatlar aynı zamanda *mexY*'yi de aşırı eksprese etti. İzolatların 7'sinde (%14,7) iki, 2'sinde (%4,2) üç efluks pompası geninin birlikteliğini saptandı (Tablo 17).

Efluks pompasının aşırı ekspresyonundan sonra en sık tespit edilen direnç mekanizması AmpC beta-laktamazın aşırı üretimi idi (%47,9). Karbapenemaz üretimi ise izolatların %14,6'sında saptandı. OprD downregülasyonu ise hiçbir izolatta tespit edilmedi.

Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatların 23'ünde (%47,9) birden fazla direnç mekanizması saptanmıştır. İzolatların hiçbirisinde *oprD* downregülasyonunu saptayamadık. Çalışmamızda izolatların 17'sinde (%35,4) efluks pompasının aşırı ekspresyonu ve indüklenebilir AmpC'nin aşırı üretiminin birlikteliği saptanmıştır (Tablo 17).

İzolatlarda en sık (%22,9) bulunan direnç mekanizması kombinasyonu *mexY*'nin aşırı ekspresyonu ve indüklenebilir AmpC birlikteliği idi. Daha sonra en sık (%12,5) tespit edilen kombinasyon *mexY* geninin aşırı ekspresyonu ve *bla_{VIM}* geni pozitifliği idi (Tablo 17).

Tablo 17. *P. aeruginosa* izolatlarında bulunan direnç mekanizması kombinasyonlarının prevalansı ve bu izolatların imipenem, meropenem ve doripenem MİK aralıkları.

Direnç mekanizma kombinasyonları	İzolatların sayısı (%)	IMP MİK(µg/ml)	MEM MİK(µg/ml)	DOR MİK(µg/ml)
Sadece <i>bla_{VIM}</i>	1 (%2,1)	>256	256	256
Sadece AmpC	6 (%12,5)	8-32	2-64	2-8
Sadece <i>mexY</i>	10 (%20,8)	16-256	8-128	4-128
Eflüks pompa aşırı ekspresyonu sadece fenotipik saptanan	1 (%2,1)	32	16	16
<i>mexY</i> + AmpC	11 (%22,9)	16-256	8-128	4-128
<i>mexY</i> + <i>bla_{VIM}</i>	6 (%12,5)	256- >256	64-256	64-256
<i>mexB</i> + <i>mexY</i>	2 (%4,2)	128-256	16-64	8-64
<i>mexY</i> + <i>mexF</i>	2 (%4,2)	32-64	32-128	8-16
Eflüks pompa aşırı ekspresyonu sadece fenotipik saptanan + AmpC	3 (%6,3)	16-32	8-128	8-64
<i>mexB</i> + <i>mexY</i> + <i>mexF</i>	1 (%2,1)	128	16	8
<i>mexD</i> + <i>mexF</i> + <i>mexY</i>	1 (%2,1)	16	8	16
<i>mexF</i> + <i>mexY</i> + AmpC	1 (%2,1)	16	8	8
<i>mexB</i> + <i>mexY</i> + AmpC	2 (%4,2)	128-256	32-128	4-16
Mekanizmaların hiçbirini içermeyen	1 (%2,1)	32	64	64

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, DOR: Doripenem

5.TARTIŞMA

Kan dolaşımı enfeksiyonları hastanelerde en sık karşılaşılan invazif enfeksiyonlardan biri olup, yüksek mortalite ve morbiditeye ek olarak hastanede yatış süresini ve maliyeti arttırmaktadır. Bununla birlikte kan dolaşımı enfeksiyonlarında erken tanı ve uygun antimikrobiyal tedavi ile mortalite oranlarının oldukça azaldığı bildirilmiştir. Kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında altın standart bir yöntemdir (1, 63). Ülkemizde Çeken ve ark. çalışmasında kan kültüründen üreyen bakterilerin %2,8'inin *P. aeruginosa* olduğunu raporlamıştır (64). Şafak ve ark. çalışmasında kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların %3,3'ünün *P. aeruginosa* olduğunu saptamıştır (65). Er ve ark. çalışmasında kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların %4,1'inin *P. aeruginosa* olduğunu belirtmiştir (66). Bizim çalışmamızda kan kültüründe bakteri üremesi saptanmış kan örneklerin %5,2'inde *P. aeruginosa* üremesi tespit edildi.

P. aeruginosa izolatlarının karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnci giderek artmaktadır. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda antimikrobiyal tedavi seçenekleri azalmaktadır (3, 67). Ayrıca karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşları ile enfekte hastalardaki ölüm oranlarının karbapenem duyarlı suşlar ile enfekte hastalara göre çok daha yüksek olduğu bilinmektedir (68). Peru'da yapılan bir çalışmada, kan kültüründe karbapenem dirençli *P. aeruginosa* üremesinin, hastane içi ölümlerde önemli bir risk faktörü olduğu saptanmıştır (69). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 yılında mevcut antibiyotiklere çok dirençli olmasından dolayı acil olarak yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken kritik öncelik listesinde yer alan üç patojen olarak karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'yı, karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*'yi ve GSBL üreten karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'yi raporlamıştır (67).

Tayvan'da Kao ve ark. kan kültüründe üreyen *P. aeruginosa* izolatlarının %5,9'unda karbapenem direnci olduğunu bildirmiştir (53). Ülkemizde Gülfem ve ark. kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %25'inin karbapenem dirençli

olduğunu raporlamıştır (70). Bizim çalışmamızda kan örneklerinden üretilen *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnç oranı %18,8 olarak saptanmıştır.

P. aeruginosa, özellikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalarda olmak üzere önemli bir nozokomiyal enfeksiyon etkenidir (68). Yatış süresinin uzun olması ve invazif girişimlere maruziyetin daha fazla olması nedeniyle yoğun bakım ünitelerinde *P. aeruginosa* enfeksiyonu daha sık görülmektedir. Ülkemizde Satılmış ve ark. çalışmasında kan kültüründe *P. aeruginosa* üremesi en sık (%63) yoğun bakım ünitelerinde tedavi alan hastalarda saptanmıştır (63). Şafak ve ark. kan kültüründe üreyen *P. aeruginosa* izolatlarının %57'sinin yoğun bakım ünitesinde, %27,9'unun çeşitli dahili servislerde, %15,1'inin cerrahi servislerde tedavi edilen hastalara ait olduğunu bildirmiştir (65). Bizim çalışmamızda daha spesifik bir grup olan karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarının 25'i (%52,1) yoğun bakım ünitesinde, 19'u (%39,6) çeşitli dahili servislerde, 4'ü (%8,3) cerrahi servislerde tedavi edilen hastaların kan örneklerinden izole edildi. Literatürdeki çalışma izolatlarının özellikleri birebir bizim çalışmamızla aynı olmasa da bizim çalışmamıza benzer şekilde yoğun bakım ünitelerinde üreme oranlarının yüksek olduğu saptanmıştır. Cerrahi servislerde tedavi gören hastalardan gönderilen kan örneklerinde ise karbapenem dirençli *P. aeruginosa* üremelerin çok daha az olduğu gözlenmiştir. Bu durum, cerrahi servislerde tedavi gören hastaların dahili servisler ve yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalara göre hastane yatış sürelerinin daha kısa olması veya kullanılan antimikrobiyal tedavi protokollerinin farklı olması gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda izolatların 36'sı (%75) üç karbapeneme grubu antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı. Bu çalışmada izolatların çoğunda karbapenemlere karşı yüksek MİK değerleri mevcuttu. Genel olarak en yüksek MİK değerleri imipenem'e karşı elde edildi. Karbapenemler arasında direnç oranı en yüksek olan imipenem, en düşük olan ise meropenemdi. Doripenem MİK değerleri EUCAST sınır değerlerine göre yorumlandığında izolatlardaki doripenem direnç oranı %97,9'du. Türkiye'de doripenem ilaç preparatlarının bulunmaması bilgisine dayanarak çalışmamızda yer alan izolatların doripenem antimikrobiyaline maruz kalmadığı öngörülmüştür. Ancak izolatların birisi haricinde tamamında doripeneme direnç (%97,9) gözlenmiştir. Bu

durum literatürdeki diğer araştırma verileri ile uyumlu bulunmuştur (71-74). Benzer durum yakın zamanda İran'da Akhi ve ark. çalışmasında da görülmüş ve imipenem ve/veya meropenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının çoğunun doripenem ülkelerinde bulunmamasına rağmen doripeneme dirençli olduğunu bildirmiştir (75). Tayvan'da Hu ve ark. çalışmasında 71 ÇİD *Pseudomonas aeruginosa* izolatının hiçbirisi imipenem ve meropeneme duyarlı değildi ve sadece 1 izolat doripenem duyarlıydı (76).

Suudi arabistan'da üçüncü basamak bir hastanede yapılan çalışmada hasta örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarının %47'sinin test edilen bir veya daha fazla karbapenem grubu antibiyotik için MİK değerinin ≥ 64 µg/ml olduğu saptanmış ve daha önceden ülkede yapılan çalışmalardan daha yüksek oranda karbapenemlere karşı yüksek düzey direnç tespit edildiği belirtilmiştir (77). Bizim çalışmamızda izolatlarının %75'inin en az bir karbapenem grubu antibiyotik için MİK değerinin ≥ 64 µg/ml olması karbapenemlere karşı yüksek düzeyde direnç oranlarının arttığını gösteren endişe verici bir bulgudur.

Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarının diğer antimikrobiyallere karşı duyarlılıklarını incelediğimizde, Hindistan'da Ellappan ve ark. 156 izolatın %100'ünün seftazidime, %94,9'unun siprofloksasine, %79,5'inin amikasinine, %2,6'sının kolistine dirençli olduğu ifade edilmiş ve karbapenem direnci olan suşlara karşı hala en etkili antimikrobiyalin kolistin daha sonra ise amikasin olduğunu bildirdikleri görülmektedir (54). Suudi arabistan'da Shaaban ve ark. 16 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının %81,3'ünün levofloksasine, %62,5'inin seftazidime ve %62,5'inin amikasinine dirençli olduğu raporlamıştır (3). Güney Kore'de Lee ve ark. 57 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %70,2'sinin sefepime, %63,2'sinin seftazidime, %59,6'sının siprofloksasine, %47,4'ünün amikasinine dirençli olduğu ve kolistine dirençli izolat olmadığı belirtmiştir (5). Tayvan'da Kao ve ark. 78 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %61,5'inin sefepime, %56,4'ünün seftazidime, %48,7'sinin levofloksasine, %47,5'inin siprofloksasine, %9'unun amikasinine dirençli saptamıştır (53). Ülkemizdeki karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde ise, Mirza ve ark. 92 izolatın %70,7'sinin siprofloksasine, %43,5'inin piperasilin/tazobaktama, %28,3'ünün seftazidime,

dirençli olduğunu raporlamıştır (67). Arıcı ve ark. 22 izolatın tamamının seftazidim, sefepim ve piperasilin-tazobaktama, %95,5'inin amikasine, %54,5'inin siprofloksasine dirençli olduğu bildirmiştir (78). Müderris ve ark. 80 izolatının %32,5'inin seftazidime dirençli olarak tespit etikleri görülmektedir (4). Başka bir çalışmada Tuğrul ve ark. 100 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında kolistin in-vitro aktivitesi incelenmiş ve çalışma izolatlarında kolistin direncine rastlanmamıştır (79). Bizim çalışmamızda izolatların %18,8'inin amikasine, %47,9'unun sefepime, %45,8'inin seftazidime, %45,8'inin piperasilin/tazobaktama, %45,8'inin siprofloksasine, %4,2'sinin kolistine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında, duyarlılık oranı en fazla olan antibiyotik kolistin, daha sonra amiksin olduğu belirlenmiştir. Çalışma izolatlarının yarısından fazlasının sefepim, seftazidim, siprofloksasin ve piperasilin/tazobaktam için yüksek dozda duyarlı olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda literatüre benzer şekilde karbapenem dirençli suşlarda diğer antimikrobiyallere karşı daha az oranda direnç tespit edildi. Özellikle karbapenem dirençli izolatların yarısından fazlasında gözlenen ve yine betalaktam grubu antibiyotikler olan seftazidim, sefepim ve piperasilin/tazobaktam'ın yüksek dozda duyarlılığı, bu betalaktamlara karşı direnç mekanizmalarının izolatlarda olmadığını düşündürmektedir.

Karbapenemler, ÇİD *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli terapötik ajanlardır (62). Suudi arabistan'da Shaaban ve ark. karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının yarısının ÇİD olduğunu saptamıştır (3). Güney Kore'de Lee ve ark. çalışmasında karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %80,7'inin ÇİD olduğunu belirtmiştir (5). Çin'de Xu ve ark. karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %46,8'inin ÇİD olduğunu tespit etmiştir (80). Bizim çalışmamızda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %50'sinin en az üç ve daha fazla antibiyotik grubundan birer antibiyotiğe direnç gösterdiği yani ÇİD olduğu saptanmıştır.

P. aeruginosa'nın karbapenem direnci, temel olarak karbapenemaz üretimi, AmpC β -laktamazın aşırı üretimi, çeşitli efluks pompalarının (MexAB–OprM,

MexCD–OprJ, MexEF–OprN, MexXY–OprM) aşırı ekspresyonu ve porin proteini OprD’inin ekspresyonunun azalması/kaybı gibi farklı direnç mekanizmaları ile ilişkilidir (4, 81). Ayrıca çalışmalarda dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompasının aşırı ekspresyonu ve AmpC’nin aşırı üretimi gibi mekanizmalarının bir arada bulunmasının, karbapenemlere karşı yüksek düzey dirençle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (81, 82).

P. aeruginosa’da karbapenemaz enzimleri bakteri hücrelerine giren karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize eder ve etkisiz hale getirir. Bu mekanizma *P. aeruginosa*’da karbapenem direncinin önemli bir nedenidir. Tüm dünyada *P. aeruginosa*’da en sık metalloβ-laktamaz (MBL) grubu karbapenemazlar saptanmaktadır. MBL’ler monobaktamlar hariç tüm β-laktam grubu antibiyotikleri hidroliz ederek *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerini daraltır (75). Karbapenemaz direnç genleri plazmitler, transpozonlar, integronlar ve profajlar üzerinde aynı veya başka bir bakteri türünden aktarılabilir. Bu aktarılabilir yapılar ile eş zamanlı olarak farklı antibiyotik direnç genleri de transfer edilebilir (22, 37, 75).

Karbapenemaz üretiminin saptanması, klinisyenleri karbapenem grubu antibiyotiklerinden başka ilaçlara yönlendirerek enfeksiyonun tedavisine yardımcı olabileceği gibi enfeksiyon kontrolü önlemlerinin alınması konusunda da önemli olacaktır. Bizim çalışmamızda karbapenemaz üretiminin fenotipik tespiti için yüksek hassasiyeti (%91-94) ve özgüllüğünün (%99-100) yanı sıra düşük maliyetli ve test prosedürü kolay olmasından dolayı çoğu laboratuvar tarafından uygulanabilen CIM testi tercih edilmiştir (45, 83). *P. aeruginosa* izolatlarının 7’sinde (%14,6) CIM testi ile karbapenemaz üretimi saptandı ve bu 7 izolatta en sık görülen karbapenemaz genleri (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* ve *bla_{OXA-48}*) araştırıldı ve tümünde *bla_{VIM}* geni tespit edildi.

Tüm dünyada ve ülkemizde *P. aeruginosa*’da en sık tespit edilen karbapenemaz geni *bla_{VIM}*’dir (22). Hırvatistan’da Bubonja-Sonje ve ark. 38 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA48}* karbapenemaz genlerinin varlığını araştırmış ancak izolatların hiçbirisinde bu genler saptanmamıştır (62). Brezilya’da Almeida ve ark. 79 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla_{VIM}*,

*bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES} karbapenemaz genlerinin varlığını araştırmış ve hiçbir izolatta saptamamıştır (84).

Fransa’da Rodríguez-Martínez ve ark. 87 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatını *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} ve *bla*_{OXA} genlerinin varlığı açısından incelemiş ve izolatların hiçbirisinde bu karbapenemaz genlerine rastlanmamıştır (30). Çin’de Yin ve ark. karbapenem dirençli 141 *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SPM}, *bla*_{BIC}, *bla*_{KPC}, *bla*_{AIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{DIM} gibi karbapenemaz genlerinin varlığı açısından araştırmış ve izolatların 11’inde (%7,8) *bla*_{IMP}, 9’unda (%6,4) *bla*_{VIM} geni saptanmıştır (85). Hindistan’da Ellappan ve ark. 156 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} ve *bla*_{OXA-48} gibi karbapenemaz genlerinin varlığını araştırmış 36’sında *bla*_{VIM}, 27’sinde *bla*_{NDM}, 2’sinde *bla*_{IMP} geni saptanmış ve *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin önemli bir nedeninin karbapenemaz enzimleri olduğu ifade edilmiştir (54). Güney Kore’de Lee J-Y ve ark. 57 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatı MBL genlerinden *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} ve *bla*_{SIM} varlığı açısından incelenmiş 13 izolatta *bla*_{IMP}, 2 izolatta *bla*_{VIM} geni saptanmıştır (5). Mısır’da Hassuna ve ark. 634 *P. aeruginosa* izolatında MBL genlerinden *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM} ve *bla*_{NDM} varlığını araştırmış 31 izolatta *bla*_{VIM}, 4 izolatta *bla*_{NDM} geni tespit edilmiştir (86).

Türkiye’de Müderris ve ark. karbapenem dirençli 80 *P. aeruginosa* izolatında karbapenemaz genlerinden *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} ve *bla*_{OXA} varlığını araştırmış ve izolatların 5’inde (%6,3) *bla*_{VIM}, 4’ünde (%5) *bla*_{KPC} geni saptanmıştır (4). Hoşbul ve ark. çalışmasında 100 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} ve *bla*_{OXA-48} genlerinin varlığı araştırılmış sadece bir izolatta *bla*_{VIM} geni tespit edilmiştir (79). Çaycı ve ark. 200 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{GES} karbapenemaz genlerinin varlığı araştırılmış bir izolatta *bla*_{VIM} ve bir izolatta *bla*_{NDM} geni saptamıştır (87). Malkoçoğlu ve ark. 84 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{GES} genlerini araştırmış iki izolatta *bla*_{VIM} geni ve bir izolatta *bla*_{GES} geni tespit edilmiştir (88). Yücel ve ark. karbapenem dirençli/yüksek dozda duyarlı 42 *P. aeruginosa* izolatında MBL

genlerinden *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* varlığını araştırmış sadece 2 izolatta *bla_{VIM}* geni saptamıştır (89).

Hastanemizde 2007 yılında Özgümüş ve ark. çeşitli hasta örneklerinden izole edilen ve karbapenem direnç profili önceden bilinmeyen 100 *P. aeruginosa* izolatında *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* genlerinin varlığını araştırmış, izolatlardan birinde (%1) *bla_{VIM}*, dokuzunda (%9) *bla_{IMP}* geni tespit edilmiştir (90). Yine hastanemizde, 2010 yılında Beşli ve ark. 334 hastanın çeşitli klinik örneklerinden karbapenem sınırda dirençli/dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL genlerinden *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* ve *bla_{SPM}* varlığını araştırmış ve izolatların 20'sinde (%6.0) sadece *bla_{VIM}*, dokuzunda (%2.7) sadece *bla_{IMP}* ve üçünde (%0.9) hem *bla_{VIM}* hem de *bla_{IMP}* olmak üzere toplam 32 izolatta (%9.6) MBL geni saptanmıştır (91). Çalışmamızda ise hastanemizde yapılan diğer iki çalışmadan daha spesifik bir grup incelenmiş olup kan örneklerinden izole edilen 48 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 7'sinde (%14,6) CIM testi ile karbapenemaz varlığı tespit edilmiş ve bunlarda *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* genlerinin varlığı araştırılmış ve hepsinde (%14,6) *bla_{VIM}* geni saptanmış diğer karbapenemaz genleri ise tespit edilmemiştir. Tüm dünyada ve ülkemizde *P. aeruginosa*'da en sık tespit edilen karbapenemaz geni olan *bla_{VIM}*, çalışmamızdaki izolatlarda da en sık saptanmıştır. Hastanemizde yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha önceden saptanan *bla_{IMP}* geninin bu çalışmadaki izolatlarda tespit edilmemesinin enfeksiyon kontrol önlemleri açısından olumlu bir gelişme olarak görmekteyiz.

Çalışmalarda, karbapenemaz genlerini barındıran *P. aeruginosa* izolatlarının yüksek karbapenem MİK değerlerine ($\geq 64\text{mg/mL}$) sahip oldukları tespit edilmiştir (53). Çalışmamızda *bla_{VIM}* geni saptanan yedi izolatın tamamında test edilen her üç karbapeneme de yüksek düzey direnç (MİK $\geq 64\text{mg/mL}$) mevcuttu. Bu durum karbapenemlerin VIM tipi karbapenemazlar tarafından etkili bir şekilde hidrolize edildiğini düşündürmektedir.

P. aeruginosa'da karbapenem direnç mekanizmalarından, AmpC β -laktamazın aşırı üretimi, efluks pompalarının aşırı ekspresyonu ve porin proteini OprD'nin ekspresyonunun azalması/kaybı kromozom aracılı olduğu bilinmektedir. Bu direnç

mekanizmaları, genellikle antipsödomonal aktiviteye sahip antibiyotiklerin aşırı kullanımıyla ve tedavi süresinin uzamasıyla ilişkilendirilmektedir (92, 93).

Çalışmamızda, karbapenem dirençli 48 *P. aeruginosa* izolatının 23'ünde (%47,9) indüklenebilir AmpC β -laktamaz varlığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Brezilya'da yapılan bir araştırmada AmpC β -laktamaz varlığı izolatların %76,6'sında saptanmış ve bizim çalışmamıza göre daha yüksek bulunmuşken, bu oran İran'da %28,5 şeklinde tespit edilmiştir (75, 94). Ülkemizde Üsküdar-Güçlü ve ark. 98 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının %15,3'ünde indüklenebilir AmpC β -laktamaz varlığını göstermiştir (95). *P. aeruginosa*'da karbapenem direnciyle AmpC'nin aşırı üretimi arasındaki ilişkinin tam olarak açıklanabilmesi için daha geniş çalışmaların yapılması gerekmektedir. AmpC beta laktamaz varlığı tedavi gören hasta grubunun tedavi protokollerine göre değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir, bu değişkenliğin nedenlerini belirlemek için daha geniş kapsamlı çalışmalar düzenlenmelidir.

P. aeruginosa'nın gram negatif bakteriler arasında efluks pompası genlerini en çok bulunduran bakteri olduğu düşünülmektedir (92). Bilinen çoklu ilaç dışı atım kapasitesine sahip altı efluks pompa ailesi vardır. Bunlar SMR, MFS, RND, ABC, MATE, PACE ailesidir. *P. aeruginosa*'da bulunan efluks pompaların çoğu RND ailesine aittir (7, 18). *P. aeruginosa*'da tespit edilen RND ailesine ait efluks pompaları, birden fazla antimikrobiyal ajan üzerinde etki gösterebildiğinden çoklu ilaç direnciyle ilişkilendirilmektedir (80). Çalışmamızda ÇİD fenotipteki 24 *P. aeruginosa* izolatının 21'inde (%87,5) efluks pompasının aşırı üretimi saptandı. RND ailesine ait MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, *P. aeruginosa*'da karbapenem direnci ile ilişkilendirilmektedir (53, 80). Petrova ve ark. MexXY-OprM efluks pompasının aşırı ekspresyonunun, *P. aeruginosa*'da karbapenem direncin ana mekanizması olduğunu bildirmiştir (96).

Efluks pompasının aşırı ekspresyonu fenotipik ve genotipik yöntemlerle gösterilebilir. Efluks pompasının fenotipik olarak analizi, efluks pompa inhibitörü varlığında ve yokluğunda bakterinin o antibiyotigine karşı MİK değerlerinin tespit edilmesiyle yapılabilir. Çalışmalarda efluks pompa inhibitörü olarak Fenilalanin-

arjinin β -naftilamid (PA β N) veya Protonofor karbonil siyanür m-klorofenilhidrazon (CCCP) kullanılmaktadır. PA β N veya CCCP varlığında ilgili antibiyotiğin MİK değerinin düşmesi bu kimyasal maddelerin efluks pompasının bir substratı olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmalarda, PA β N'nin sadece efluks pompalarını inhibe etmediği, aynı zamanda gram negatif bakterilerin dış membran geçirgenliğini arttırabildiği ifade edilmiştir (35). Dış membran geçirgenliğinin artması da PA β N'nin ve antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonlarının artmasına neden olabilmektedir. Ancak çalışmalarda, PA β N'nin efluks pompa inhibisyonu ve dış membran geçirgenliğini arttırmasının doza bağlı olarak değişebilen özellikler olduğu tespit edilmiştir. Düşük PA β N dozlarında efluks pompalarının spesifik olarak inhibe olduğu, yüksek PA β N konsantrasyonlarında bakterilerin dış membran geçirgenliğinin arttığı görülmüştür (97). Bu çalışmada PA β N konsantrasyonunun bakterinin dış membran geçirgenliğini etkilememesi böylece sadece efluks pompa inhibisyonu etkisini inceleyebilmek için PA β N'nin son konsantrasyonu 25 μ g/ml olacak şekilde tasarlandı (52).

İran'da Akhi ve ark. 42 karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'da efluks pompasının aşırı ekspresyonun saptanmasında bizim çalışmamıza benzer fenotipik yöntem ile test etmiş izolatların %26,1'inde aşırı eksprese edilmiş efluks pompalarının varlığını ifade etmiştir (75).

Çin'de Xu ve ark. 62 KDPA izolatında efluks pompasının fenotipik aktivitesinin artışını tespit etmek için izolatların Pa β N varlığında ve yokluğunda meropenem MİK seviyelerini incelenmiş ve sadece 8'inde anlamlı bir azalma saptamıştır. Bu izolatlardan 5'inde *mexA* geninin aşırı eksprese olduğu tespit edilmiş diğer efluks pompa genleri araştırılmamıştır (80).

Tayvan'da Kao ve ark. 78 imipenem dirençli *P. aeruginosa*'da efluks pompasının fenotipik aktivitesinin artışını Pa β N varlığında ve yokluğunda meropenem MİK seviyeleri saptanarak test edilmiş, izolatlarının 58'inde (%74,4) dört kat ve daha fazla azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 29'unda *mexA*, *mexC*, *mexE* ve *mexX* efluks genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmış. İzolatların %62,1'inde MexXY-OprM, %20,7'sinde MexEF-OprN, %20,7'sinde MexCD-OprJ efluks pompası aşırı ekspresyonu saptanmış. 8 izolatta ise herhangi bir efluks geninin

ekspresyon seviyesinin artışı saptanmamıştır (53). Bizim çalışmamızda da benzer olarak izolatların 35'inde (%72,9) tek başına meropenem ile karşılaştırıldığında PA β N ile kombinasyon halinde meropenem MİK'inde anlamlı bir düşüş belirlendi. Çalışmamızda da benzer şekilde en sık *mexY* (%75) efluks pompası geni aşırı ekspresyonu tespit edildi ve dolayısıyla MexXY-OprM efluks pompasının aşırı ekspresyonu saptandı. Bununla birlikte çalışmamızda izolatların 31'inde en az bir efluks pompası geni RT-PCR ile saptandı ancak 4 izolatta herhangi bir efluks geni saptanmadı. Muhtemelen karbapenem duyarlılığını azaltan ve PA β N'ye duyarlı farklı efluks pompası içeren bu 4 izolatın araştırılması gerektiğini düşünüyoruz. Fransa'da Rodríguez-Martínez ve ark. karbapeneme dirençli 32 izolatta MexAB-OprM, MexXY-OprM ve MexCD-OprJ efluks pompalarının aşırı ekspresyonu RT-PCR ile incelemiş, %37,5'inde *mexY*, %31'inde *mexD* ve %28'inde *mexB* geninin aşırı ekspresyonu saptamakla birlikte izolatların %59,4'ünde en az bir efluks pompasını aşırı ekspresyonu bildirmişlerdir ve efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun karbapenem direncine önemli katkı sağladığı ifade etmişlerdir (30). İspanya'da Cabot ve ark. kan kültüründen izole edilen 190 *P. aeruginosa* suşunda *mexB*, *mexY*, *mexD* ve *mexF* gen ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlendi. İzolatların %13,2'sinde *mexY*, %12,6'sında *mexB*, %4,2'sinde *mexF* ve %2,2'sinde *mexD* efluks pompa geninin aşırı ekspresyonu saptandı (61). Mısır'da Hassuna ve ark. 32 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *mexA*, *mexC*, *mexE*, *mexY* gen ekspresyonunu RT-PCR ile araştırmıştır. İzolatların %75'inde MexCD-OprJ, %62'sinde MexXY-OprM, %21,8'inde MexAB-OprM, %18,7'sinde MexEF-OprN'in aşırı eksprese edildiği saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada karbapenem duyarlı ve dirençli izolatlar arasında MexXY-OprM ve MexCD-OprJ efluks pompası ekspresyonu açısından da anlamlı bir fark olduğu ifade edilmiştir (86). Çalışmamızda MexCD-OprJ efluks pompasının aşırı ekspresyonu izolatların %1'inde, MexXY-OprM (%75) efluks pompası aşırı ekspresyonu izolatların %75'inde saptandı. Çalışmamızın bulguları, *mexY* efluks geninin aşırı ekspresyonunun karbapenem direnci ile daha sıkı ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda benzer şekilde izolatların %75'inde en az bir efluks pompa geninin aşırı ekspresyonu saptandı ve en sık aşırı ekspresyonu saptanan efluks pompası geni benzer şekilde *mexY*'di. Ülkemizde Müderris ve ark. 80 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında

mexB, *mexY*, *mexD* gen ekspresyon seviyesinin artışı RT-PCR ile araştırmıştır. İzolatların %16,3'ünde *mexB*, %2,5'inde *mexY* ve %2,5'inde *mexD* geninin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (4).

Güney Kore'de Lee ve ark. 57 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* efluks pompası genlerinin ekspresyon seviyelerini araştırmış ve izolatların %56,1'inde *mexB*, %19,3'ünde *mexD*, %15,8'inde *mexY*, %3,5'inde *mexF* geninin aşırı ekspresyonu belirlenmiştir (5). Yine Güney Kore'de Kim ve ark. 22 KDPA izolatında *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY* genlerin aşırı ekspresyonun varlığını araştırmış ve izolatların hiçbirisinde bu efluks pompası genlerinin aşırı ekspresyonunu saptamamıştır (68). İran'da Rostami ve ark. 19 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında *mexB* ve *mexY* genlerinin ekspresyon seviyelerini araştırmış ve izolatların %63,2'sinde *mexB*, %52,6'sında *mexY* geninin aşırı ekspresyonunu tespit etmiştir (81).

P. aeruginosa'da farklı efluks pompa genlerinin aşırı ekspresyonun birarada olabilmesi literatür taramasında göze çarpmaktadır. İspanya'da Cabot ve ark. kan kültüründen izole edilen 190 *P. aeruginosa* suşunun %5,3'ünde *mexB* ve *mexY* birlikteliği tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (61). Başka çalışmalarda da *P. aeruginosa* izolatlarında *mexB* ve *mexY* geninin ekspresyon seviyesinin artışının eş zamanlı bulunduğu gösterilmiştir (61, 98). Tayland'da yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %92,06'sının MexAB-OprM, %63,49'unun MexXY efluks pompasını aşırı eksprese ettiğini ve MexXY efluks pompasını aşırı eksprese eden izolatların biri haricinde tümünün MexAB-OprM'yi de aşırı eksprese ettiği bulundu (99). Bizim çalışmamızda *mexB* ve *mexY* birlikteliği izolatların %10,5'inde gözlemlendi. Literatürde efluks pompa geninin birlikte aşırı ekspresyonlarının mekanizmalarını açıklayan daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızdaki 48 izolattan 35'inde (%72,9) PAβN varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azaldı dolayısıyla efluks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edildi. Meropenem dirençli fenotipteki bu 35 izolattın 34'ü PAβN eklenmesiyle duyarlı veya yüksek dozda duyarlı fenotiplere dönüşmüştür. PAβN ile meropenem arasında gözlemlenen sinerji, efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun

karbapenem direncine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Fenotipik olarak efluks pompası tespit edilen ancak moleküler olarak *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY*'nin aşırı ekspresyonu saptanmayan 4 izolat belirlendi. Bu izolatların tamamında en az bir efluks pompasının sınırda ekspresyonu mevcuttu. Aynı zamanda bu 4 izolatın 3'ünde ek olarak AmpC'nin aşırı ekspresyonu da tespit edildi. PAβN varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azalmayan 13 izolatın 5'inde efluks pompa geninin aşırı ekspresyonu RT-PCR ile tespit edildi ve bu izolatlar aynı zamanda karbapenemaz üreten izolatlardı. Bu izolatlarda PAβN varlığında efluks pompası inhibe olsa da karbapenemaz üretiminin meropenem MİK değerinin azalmasına engel olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda, RT-PCR ile izolatların 36'sında (%75) *mexY*, 5'inde (%10,5) *mexB*, 5'inde(%10,5) *mexF* ve 1'inde (%2) *mexD* efluks pompası geninin aşırı ekspresyonu saptandı. 31 izolatta hem RT-PCR ile efluks pompası genlerinden bir veya daha fazlasının aşırı ekspresyonu hem de fenotipik yöntemle efluks pompasının aktivite artışı belirlendi.

Çalışmalarda meropenemin doripenemden daha fazla efluks pompalarına duyarlı olduğu raporlanmıştır (81). Bizim çalışmamızda da en sık saptanan direnç mekanizması efluks pompalarının aşırı ekspresyonuydu ve izolatlarda genel olarak meropenem MİK değerlerinin doripenem MİK değerlerinden daha yüksek olduğunu saptadık.

Karbapenemaz enzimi yokluğunda oksimino-sefalosporinlere duyarlı karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatları son yıllarda giderek artmaktadır. Pournaras ve ark. seftazidim duyarlı karbapenem dirençli izolatlarda, efluks pompasının aşırı üretiminin bu direnç fenotipine neden olduğunu ifade etmişlerdir (93). Bizim çalışmamızda da karbapenem dirençli izolatların yarısından fazlasında betalaktam grubu antibiyotikler olan seftazidim, sefepim ve piperasilin/tazobaktam duyarlıydı. Bu durum efluks pompasının aşırı ekspresyonu gibi karbapenemaz üretimi dışında diğer karbapenem direnci mekanizmalarının daha yaygın hale gelmesinin nedeni olabilir. Efluks pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı gelişen karbapenem direnç mekanizmasının daha iyi bilinmesi, karbapenemaz üretmeyen karbapenemlere

dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlerin kullanımının artmasını sağlayacaktır.

P. aeruginosa'nın karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direncinin, proteindeki durdurma kodonları, polimorfizmler, ekleme dizileri veya silinmelerin varlığına bağlı olarak OprD porin proteini ekspresyonunun azalması veya kaybolmasından kaynaklanabileceği bilinmektedir (54, 100). Porin proteini OprD, *P. aeruginosa*'nın yüzeye özgü bir dış zar porinidir. OprD imipenem, meropenem ve doripenem'in hücre içine difüzyonunu sağlar. OprD'nin ekspresyonunun azalmasının/kaybının *P. aeruginosa*'da karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılığını azalttığı ve MİK değerlerini arttırdığı bilinmektedir (54, 75, 101). Ellappan ve ark. imipeneme duyarlı *P. aeruginosa* izolatlarında *oprD* ekspresyonunun normal seviyelerde olduğunu, imipeneme dirençli izolatlarda ekspresyonunun olmadığını saptamıştır (54).

Müderis ve ark. 80 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının %55'inde *oprD* ekspresyon seviyesinin azalmasını saptamış ve bu izolatların %70,5'inde diğer karbapenem direnç mekanizmaları tespit etmemiştir. Bu nedenle *oprD* ekspresyon seviyesinin azalmasının karbapenem direncinde önemli olduğunu vurgulamıştır (4).

Çalışmamızda, *oprD* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı azalmasını izolatların hiçbirinde saptayamadık. Çalışmamızda izolatlarda *oprD* gen ekspresyon seviyesi RT-PCR ile iki farklı primer kullanılarak araştırıldı. Ancak *oprD*(B) primeri ile yapılan amplifikasyon işlemlerinde herhangi bir amplifikasyon eğrisi elde edilmedi. *oprD*(A) primeri ile ise sadece 14 izolatta amplifikasyon gerçekleşti. Bu izolatlardan sadece birisinde referans suş PAO1'e göre *oprD* seviyesinde azalma tespit edildi ancak bu azalma anlamlı değildi. Geri kalan 13 izolatta ise referans suşa kıyasla *oprD* seviyesinde bir azalma yoktu. *oprD*(A) primeri ile kalan 34 izolatta *oprD*'ye yönelik PCR ürünü saptanmadı. Bu durum gen delesyonundan ya da L2 ve L3 döngülerindeki mutasyonlar gibi OprD proteininde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonel değişikliklerden kaynaklanmış olabilir (4, 98). Ayrıca OprD porin proteini yokluğu, gen dizisindeki prematüre durdurma kodonlarının varlığından kaynaklanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, *oprD* geninde prematüre durdurma

kodonlarının varlığının, *P. aeruginosa*'da *oprD* ekspresyonunun gözlenmemesinin nedeni olarak belirtilmiştir (100). Başka bir çalışmada ise *oprD* geninde IS Pa1328 insersiyon dizisinin OprD protein ekspresyonunu inhibe ettiğini belirtilmiştir (100). *P. aeruginosa* izolatlarında *oprD* geninin inaktivasyonu ile OprD proteini üretiminde kayıba neden olarak karbapenem direnciyle ilişkilendirilen IS Pa 26, ISRP10, IS Pa 1328, IS Pa 133, IS Pre2, IS Pa 8, IS Pa 1635, IS Pa 46 gibi birçok insersiyon dizisi dünya çapında bildirilmektedir (102).

oprD geninde oluşabilecek mutasyonların işlevsel mutasyon olup olmadığını anlamak, böylece tespit edilen mutasyonların karbapenem direncinden sorumlu olup olmadığını doğrulamak için hem *oprD* geninin sekanslanması hem de dış zarda OprD proteininin varlığı western blot analizi ile incelenmelidir. Güney Kore'de Kim ve ark. 22 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 21'inde *oprD* geninde mutasyon saptamışlardır. Çerçeve kayması mutasyonlarına sahip 7 izolat dışındaki kalan 15 izolatta RT-PCR ile *oprD* gen ekspresyon seviyesi araştırılmış, sadece 5 izolatta *oprD* ekspresyon seviyesinin azaldığını, diğer izolatlarda ise *oprD* gen ekspresyonu azalmadığını tespit etmişlerdir. Dış zarda OprD proteininin varlığını belirlemek için, dış zar proteinleri ayrılarak western blot analizi yapılmış ve izolatların hepsinde dış zarda *oprD* ekspresyonu olmadığı belirtilmiştir. Öyle ki bu çalışmada, RT-PCR ile *oprD* gen ekspresyonu tespit edilen şuşlarda bile dış zarda western blot analizi ile *oprD* ekspresyonu saptanmamıştır (68). Bu çalışmada *oprD*'nin mutasyonel inaktivasyonu ve dış zardaki OprD kaybına bağlı olarak karbapenemlerin geçirgenliğinin azalmasının *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinin en önemli nedeni olduğu vurgulanmıştır (68).

Çalışmamızda özellikle karbapenemaz üretimi olmayan ve PAβN varlığında meropenem MİK değerleri dört kat veya daha fazla azalmayan izolatlardaki yüksek karbapenem MİK değerlerinin muhtemelen porin mutasyonlarıyla ve dış zardaki OprD kaybıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarında dört ana karbapenem direnç mekanizması (Porin proteini geni *oprD*'nin ekspresyonunun azalması, efluks pompalarını aşırı ekspresyonu, karbapenemaz üretimi ve indüklenebilir AmpC'nin aşırı üretimi) araştırılmıştır ve karbapenem direnci mekanizmalarının kombinasyonları

tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatların 23'ünde (%47,9) birden fazla direnç mekanizması tespit edilmiştir. Çalışmamızda izolatların 17'sinde (%35,4) efluks pompasının aşırı ekspresyonu ve indüklenebilir AmpC'nin aşırı üretiminin birlikteliği, izolatların 6'sında (%12,5) efluks pompasının aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz üretiminin birlikteliği saptanmıştır. Çalışmamızda izolatlarda *oprD* ekspresyonunun azalmasını tespit etmedik. Ancak çalışmamızda OprD aracılı direnç mekanizmasını sadece transkripsiyon seviyesinde araştırdık. *oprD* geninde inaktivasyonuna yol açan mutasyonların ve western blot analiziyle dış zarda OprD kaybı gösterilmemesi çalışmamızın kısıtlılıklarından birisidir. Bu mekanizma tam olarak araştırılıysaydı karbapenem direnci mekanizmalarının kombinasyon oranlarının daha da yüksek olacağını, porin mutasyonlarıyla ve dış zardaki OprD kaybının karbapenem direnciyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda meropenemin hücre içine taşınmasında rol oynayan OpdD/OccK7 ve OpdP/OccD3 gibi diğer *P. aeruginosa* porin proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin ve mutasyonlarının araştırılmaması çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.

Bazı çalışmalarda karbapenemaz üretiminin yüksek düzeyde karbapenem direnciyle ilişkili olduğu; efluks pompalarının ekspresyonun artması, porin proteini OprD'nin ekspresyonunun azalması/kaybı ve AmpC β -laktamaz aşırı üretiminin ise genellikle düşük-orta düzeyde karbapenem direnciyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (61, 103). Ancak efluks pompalarının ekspresyonun artması, AmpC β -laktamazın aşırı üretimi ve porin proteini OprD'nin ekspresyonunun azalmasının/kaybının yüksek düzeyde karbapenem direnciyle ilişkili olabileceğini belirten fazla sayıda çalışma mevcuttur (82, 104). Çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinin efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, AmpC β -laktamazın aşırı üretimi ve ekspresyonunun azalması/kaybı gibi çeşitli direnç mekanizmalarının birlikteliğinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (80, 82, 105). Feng ve ark. çalışmasında efluks pompalarının ve *ampC*'nin aşırı ekspresyonunun özellikle meropenem direnci ile çok iyi bir korelasyon gösterdiğini bulmuştur (106). Güney Kore'de Lee ve ark. 57 KDPA izolatının 24'ünün (%42,1) *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY* genlerinden en az birisi ve *ampC* geninin aşırı ekspresyonunun birlikteliğini saptamışlardır (5). Bizim çalışmamızda en fazla bulunan direnç mekanizması efluks pompalarının

ekspresyonunun artması ve AmpC'nin aşırı üretimi idi. Karbapenemaz enzimleri tespit edilmeyen suşlarda bile bu mekanizmaların varlığında karbapenemlere karşı yüksek MİK değerleri elde edildi. Biz de efluks pompalarının ekspresyonunun artmasının, porin proteini geni *oprD*'nin ekspresyonunun azalmasının/kaybının ve AmpC'nin aşırı üretiminin karbapenem direncinde hafife alındığını, bu mekanizmaların ana karbapenem direnç mekanizması olabileceğini düşünmekteyiz.



6. Sonuç ve Öneriler

6.1. Sonuç

- İzolatların tamamı imipeneme, %97,9'u doripeneme, %75'i meropeneme dirençli bulundu.
- Çalışmamızda izolatlarının %75'inin en az bir karbapenem grubu antibiyotik için MİK değeri ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu.
- İzolatların yarısının çok ilaca dirençli olduğu saptandı.
- Çalışmamızda karbapenem dirençli izolatlarda, kolistin ve amikasinin çoğunlukla etkili bir antibiyotik olduğu belirlendi.
- İzolatların 7'sinde (%14,6) fenotipik olarak karbapenemaz varlığı tespit edildi ve *bla_{VIM}* geni bulundu diğer karbapenemaz genleri ise tespit edilemedi.
- İzolatların 23'ünde (%47,9) indüklenebilir AmpC β -laktamaz varlığı saptandı.
- İzolatların 35'inde (%72,9) fenotipik olarak efluks pompasının aşırı ekspresyonu tespit edildi.
- İzolatların 36'sında (%75) *mexY*, 5'inde (%10,5) *mexB*, 5'inde (%10,5) *mexF* ve 1'inde (%2) *mexD* efluks pompası geninin aşırı ekspresyonu saptandı.
- İzolatların hiçbirinde *oprD* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı azalması belirlenemedi

6.2. Öneriler

- OprD porin proteinin kaybı/ekspresyonunun azalması aracılı direnci sadece transkripsiyon seviyesinde araştırmamız çalışmamızın kısıtlılıklarından biridir. *OprD* geni inaktivasyonuna yol açan mutasyonların ve western blot analiziyle dış membranda OprD porin proteininin kaybının gösterilmesi gibi daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.
- Çalışmamızda karbapenemleri etkili bir şekilde hidroliz eden VIM tipi karbapenemazların hastanemizde ciddi bir terapötik tehdit olabileceği düşünülmektedir. Etkili enfeksiyon kontrol önlemleriyle hastanelerde karbapenemaz üretimi olan şuşların yayılımı önlenmelidir.

- Çalışmamızdaki karbapenem dirençli izolatların %50'sinin ÇİD oluşu gelecekte karşımıza çıkabilecek pan-drug resisten izolatların habercisi olduğu düşünülmektedir.
- *P. aeruginosa* 'da karbapenem direnç mekanizmalarının netleştirilmesi etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır. Bu nedenle çok daha geniş sayılara ulaşan çok merkezli araştırmalar planlanmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Coşkun USS. Kan Kültürlerinde Üreyen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2018;32(2):45-52.
2. Çelik C, Gözel MG, Uysal EB, Bakıcı MZ, Gültürk E. Kan Akımı İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Paterni: Altı Yıllık Değerlendirme. Klimik Journal/Klimik Dergisi. 2013;26(3).
3. Shaaban M, Al-Qahtani A, Al-Ahdal M, Barwa R. Molecular characterization of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to carbapenems. The Journal of Infection in Developing Countries. 2017;11(12):935-43.
4. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydoğan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. The Journal of Infection in Developing Countries. 2018;12(01):001-8.
5. Lee J-Y, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. International journal of antimicrobial agents. 2012;40(2):168-72.
6. Pitt TL, Simpson AJ. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. Principles and practice of clinical bacteriology. 2006;2:427-43.
7. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. 2022;23(24).
8. Palleroni N. Genus I. *Pseudomonas*. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1984;1:141-99.
9. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. United States: The McGraw-Hill Companies; 2013.
10. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Edited by Jonathan Joyce, John Larkin. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017.
11. H. B. Klinik mikrobiyolojik tanı: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları; 2000. s 175-97 p.
12. SIRIKEN B, Veli Ö. *Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi. 2017(18):42-52.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. . Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
14. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):199.
15. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):35-51.
16. W. L. Review of medical microbiology and immunology. 14th ed: McGraw-Hill; 2016.
17. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:39.

18. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.
19. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):811-4.
20. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1306-11.
21. Holmes CL, Anderson MT, Mobley HLT, Bachman MA. Pathogenesis of Gram-Negative Bacteremia. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(2).
22. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2021;12:614058.
23. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S565-s75.
24. Lee YL, Ko WC, Hsueh PR. In vitro activities of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, meropenem-vaborbactam and other comparators against *Pseudomonas aeruginosa* isolates with discrepant resistance to carbapenems: Data from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2012-2021. *Int J Antimicrob Agents.* 2023;62(2):106867.
25. Castanheira M, Doyle TB, Hubler CM, DeVries S, Shortridge D. Vaborbactam increases meropenem susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates displaying MexXY and AmpC upregulation. *mSphere.* 2023;8(5):e0016223.
26. Souha S Kanj. Principles of Antimicrobial Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infections[İnternet]. 2024 [updated 6 Şubat 2024 Erişim Tarihi: 28 Şubat 2024. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/principles-of-antimicrobial-therapy-of-pseudomonas-aeruginosa-infections>.
27. Canton R, Doi Y, Simner PJ. Treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case for cefiderocol. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(8):1077-94.
28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints - breakpoints and guidance [İnternet]. 2023 [updated 2 Ocak 2023 Erişim Tarihi: 16 Temmuz 2023. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
29. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(4):707-21.
30. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4783-8.
31. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(5):698-722.
32. Savinova TA, Samchenko AA, Bocharova YA, Mayansky NA, Chebotar IV. Computer Program for Detection and Analyzing the Porin-Mediated Antibiotic Resistance of Bacteria. *Sovrem Tekhnologii Med.* 2021;13(6):15-22.
33. Farra A, Islam S, Strålfors A, Sörberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(5):427-33.

34. 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. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4).
35. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015;6:660.
36. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51.
37. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-92.
38. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1553-5.
39. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(7):1584-90.
40. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):891-7.
41. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(2):257-66.
42. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(8):3929-31.
43. Standartları UM. Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara. 2014.
44. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, et al. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):601-4.
45. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3):e0123690.
46. 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 beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):490-5.
47. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3261-5.
48. Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(12):E506-13.

49. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22.
50. Kumar V, Sen MR, Nigam C, Gahlot R, Kumari S. Burden of different beta-lactamase classes among clinical isolates of AmpC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients: A prospective study. *Indian J Crit Care Med*. 2012;16(3):136-40.
51. Upadhyay S, Sen MR, Bhattacharjee A. Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* expressing AmpC beta-lactamase enzyme. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(4):239-42.
52. Vera-Leiva A, Carrasco-Anabalón S, Lima CA, Villagra N, Domínguez M, Bello-Toledo H, et al. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;12:73-6.
53. Kao CY, Chen SS, Hung KH, Wu HM, Hsueh PR, Yan JJ, et al. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):107.
54. Ellappan K, Belgode Narasimha H, Kumar S. Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital in South India. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;12:37-43.
55. Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2007;27:763-7.
56. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
57. Serra C, Bouharkat B, Tir Touil-Meddah A, Guénin S, Mullié C. MexXY Multidrug Efflux System Is More Frequently Overexpressed in Ciprofloxacin Resistant French Clinical Isolates Compared to Hospital Environment Ones. *Front Microbiol*. 2019;10:366.
58. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, et al. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(1):125-31.
59. Poonsuk K, Chuanchuen R. Detection of the mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* by using a combined resistance-phenotypic markers and multiplex RT-PCR. *Open Journal of Medical Microbiology*. 2014;4(03):153.
60. Shigemura K, Osawa K, Kato A, Tokimatsu I, Arakawa S, Shirakawa T, et al. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015;68(9):568-72.
61. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):1906-11.
62. Bubonja-Sonje M, Matovina M, Skrobonja I, Bedenic B, Abram M. Mechanisms of Carbapenem Resistance in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Croatian Hospital. *Microb Drug Resist*. 2015;21(3):261-9.

63. Satılmış Ş, Aşgin N. Kan Kültüründe Sıklıkla İzole Edilen Bakterilerin ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Yıllara Göre Dağılımı. ANKEM Dergisi. 2019;33(3):95-101.
64. Çeken N, Duran H, Kula Atık T. Kan kültüründen izole edilen gram negatif bakterilerin dağılımı ve antibiyotik direnç oranları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2022;79(3):451-60.
65. Safak B, Kilinc O. Microorganisms Isolated From Blood Cultures During 2010-2015 and Their Antimicrobial Susceptibilities/2010-2015 Yılları Arasında Kan Kulturlerinde Üreyen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Klimik Journal. 2016;29(2):60-5.
66. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. 2015.
67. Mirza Hc, İnce Ceviz G. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı sefidierokol, imipenem/relebaktam ve diğer antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması. Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji. 2022;79(3).
68. Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, et al. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. J Microbiol. 2016;54(1):44-9.
69. Krapp F, García C, Hinostroza N, Astocondor L, Rondon CR, Ingelbeen B, et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Bloodstream Infections in Peru and Associated Outcomes: VIRAPERU Study. Am J Trop Med Hyg. 2023;109(5):1095-106.
70. Ece G. Kan Kültüründe Üreyen İzolatların Dağılım ve Antibiyotik Duyarlılık Profiline İncelenmesi. Medical Bulletin of Haseki/Haseki Tıp Bulteni. 2013;51(4).
71. Yaman G, Gündüoğlu H, ÇIKMAN A, Bektaş A, Berktaş M. Nozokomiyal *Pseudomonas Aeruginosa* İzolatlarında Doripenem Duyarlılık Oranlarının E-Test Yöntemiyle Araştırılması. Sakarya Tıp Dergisi. 2011;1(3):93-7.
72. Durmaz S, Özer TT. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. Abant Tıp Dergisi. 2015;4(3):239-42.
73. Aslan S, Yenişehirli G, Dalgıç BÇT, Yenişehirli A. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçlarının EUCAST ve CLSI Sınır Değerlerine Göre Karşılaştırılması ve Metallo Beta Laktamaz Varlığının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2022;175.
74. Negi A, Anand M, Singh A, Kumar A, Sahu C, Prasad KN. Assessment of Doripenem, Meropenem, and Imipenem against Respiratory Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of North India. Indian J Crit Care Med. 2017;21(10):703-6.
75. Akhi MT, Khalili Y, Ghotaslou R, Yousefi S, Kafil HS, Naghili B, et al. Evaluation of Carbapenem Resistance Mechanisms and Its Association with *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Northwest of Iran. Microb Drug Resist. 2018;24(2):126-35.
76. Hu YF, Liu CP, Wang NY, Shih SC. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Infect Dis. 2016;16(1):444.
77. Al-Agamy MH, Jeannot K, El-Mahdy TS, Samaha HA, Shibl AM, Plésiat P, et al. Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to

- Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2016;2016:4379686.
78. Arici N, Kansak N, Adaleti R, İlhan S, Özdemir R, Şenbayrak S, Et Al. Ventilatör İlişkili Pnömoni Etkeni Karbapenem Dirençli *Klebsiella Pneumoniae* ve *Pseudomonas Aeruginosa* İzolatlarında Seftazidim-Avibaktamin In Vitro Etkinliği. *Ankem Dergisi*. 2023;37(2):57-64.
79. Tuğrul H, Canset A, Sinem K, Orhan B, Hande Ö, Ramazan G. Seftazidim-Avibaktam Ve Kolistinin Karbapenem Dirençli *Pseudomonas Aeruginosa* Klinik İzolatlarına Karşı İn Vitro Aktivite. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*. 2022;85(3):355-61.
80. Xu Y, Niu H, Hu T, Zhang L, Su S, He H, et al. High Expression of Metallo- β -Lactamase Contributed to the Resistance to Carbapenem in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Baotou, China. *Infect Drug Resist*. 2020;13:35-43.
81. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A, et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):127-32.
82. Chalhoub H, Sáenz Y, Rodriguez-Villalobos H, Denis O, Kahl BC, Tulkens PM, et al. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):740-3.
83. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11).
84. Almeida MM, Freitas MT, Folescu TW, Firmida MC, Carvalho-Assef APD, Marques EA, et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infection: Current Resistance Profile and Hypermutability in Patients with Cystic Fibrosis. *Curr Microbiol*. 2021;78(2):696-704.
85. Yin S, Chen P, You B, Zhang Y, Jiang B, Huang G, et al. Molecular Typing and Carbapenem Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From a Chinese Burn Center From 2011 to 2016. *Front Microbiol*. 2018;9:1135.
86. Hassuna NA, Darwish MK, Sayed M, Ibrahim RA. Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:285-93.
87. Cayci YT, Biyik I, Birinci A. VIM, NDM, IMP, GES, SPM, GIM, SIM Metallobetalactamases in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from a Turkish University Hospital. *Journal of Archives in Military Medicine*. 2022(In Press).
88. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2017;23(3):328-34.
89. Yucel FY, Cakirlar FK, Koyuncu E, Ozturk R. Detection of IMP, VIM and NDM metallo-betalactamase carbapenemase genes in carbapenem resistant pseudomonas strains from bloodstream infections in Istanbul, Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;45:99.
90. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksali I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo- β -

lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2007;13(3):191-8.

91. Üreten M-BL, Moleküler S. Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of Metallo-beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. 2018.

92. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):609-16.

93. Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, Ikonomidis A, Tassios PT, Tsakris A, et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(4):761-4.

94. Dantas RCC, Silva RTE, Ferreira ML, Gonçalves IR, Araújo BF, Campos PA, et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176774.

95. Uskudar-Guclu A, Mirza HC, Unlu S. Co-existence of Multiple Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. 2022.

96. Petrova A, Feodorova Y, Miteva-Katrandzhieva T, Petrov M, Murdjeva M. First detected OXA-50 carbapenem-resistant clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* from Bulgaria and interplay between the expression of main efflux pumps, OprD and intrinsic AmpC. *J Med Microbiol*. 2019;68(12):1723-31.

97. Misra R, Morrison KD, Cho HJ, Khuu T. Importance of Real-Time Assays To Distinguish Multidrug Efflux Pump-Inhibiting and Outer Membrane-Destabilizing Activities in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2015;197(15):2479-88.

98. Wołkowicz T, Patzer JA, Kamińska W, Gierczyński R, Dzierżanowska D. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: Characterisation of two novel insertion sequences disrupting the oprD gene. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;7:119-25.

99. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Santanirand P, Kiratisin P, Chomnawang MT. Molecular investigation of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated clinically in Thailand. *Microbiol Immunol*. 2013;57(3):170-8.

100. González-Vázquez MC, Rocha-Gracia RDC, Carabarin-Lima A, Bello-López E, Huerta-Romano F, Martínez-Laguna Y, et al. Location of OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Apmis*. 2021;129(4):213-24.

101. Akhi MT, Khalili Y, Ghotaslou R, Kafil HS, Yousefi S, Nagili B, et al. Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *J Chemother*. 2017;29(3):144-9.

102. Shariati A, Azimi T, Ardebili A, Chirani AS, Bahramian A, Pormohammad A, et al. Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect*. 2018;21:75-80.

103. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*. 2011;2:65.

104. Aghazadeh M, Hojabri Z, Mahdian R, Nahaei MR, Rahmati M, Hojabri T, et al. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase

and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. *Infect Genet Evol.* 2014;24:187-92.

105. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1633-41.

106. Feng W, Huang Q, Wang Y, Yuan Q, Li X, Xia P, et al. Changes in the resistance and epidemiological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* during a ten-year period. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021;54(2):261-6.

