

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Tablolar	III
Şekiller	IV
Resimler	V
Kısaltmalar	VI
Önsöz	VII
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
3 MATERYAL METOD	51
4 BULGULAR	68
5 TARTIŞMA VE SONUÇ	76
ÖZET	92
SUMMARY	94
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	105

TABLÖLAR

		sayfa no
Tablo 1	<i>Pseudomonadaceae</i> ailesinin sınıflandırılması	5
Tablo 2	Kinolonların sınıflandırılması	31
Tablo 3	<i>P.aeruginosa</i> 'da kinolon direncini belirleyen bölgede GyrA geninde meydana gelen aminoasit değişimleri	35
Tablo 4	<i>P. aeruginosa</i> 'nın kinolon direncinde rol alan pompa sistemleri	37
Tablo 5	Nonfermentatif bakterilerin izole edildiği klinik örnekler	53
Tablo 6	Karbonhidrat oksidasyon fermentasyon testleri için kullanılan besiyeri bileşimi	55
Tablo 7	Lizin dekarboksilaz testi için kullanılan besiyeri bileşimi	57
Tablo 8	Hareket besiyeri için kullanılan besiyeri bileşimi	58
Tablo 9	Jelatin hidrolizi testi için kullanılan besiyeri bileşimi	58
Tablo 10	Amplifikasyon ve dizi analizi için kullanılan primerler	62
Tablo 11	Fenotipik testler sonucunda nonfermentatif bakterilerin tür dağılımları	69
Tablo 12	MİK(µg/ml) değerleri ve duyarlılık dereceleri	71
Tablo 13	<i>P.aeruginosa</i> suşlarının ofloksasine duyarlılık yüzdeleri	72
Tablo 14	<i>P.aeruginosa</i> suşlarının 336 bç'lik gyrA gen bölgesinin dizi analizi sonuçları	74
Tablo 15	Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda <i>Pseudomonas</i> kökenlerinde belirlenen siprofloksasin ve ofloksasin direnç oranları	78
Tablo 16	Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda <i>Pseudomonas</i> kökenlerinde belirlenen siprofloksasin ve ofloksasin direnç oranları	82
Tablo 17	<i>P.aeruginosa</i> izolatlarının gyrA gen bölgelerinde bulunan sessiz mutasyon tipleri	88

ŞEKİLLER

		sayfa no
Şekil 1	Otomotize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları	48
Şekil 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşunun gyrA forward ve reverse primer çiftinin gyrA üzerindeki yerleşimi	63
Şekil 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşunda GyrA gen bölgesinin kromotogram analizi	73

RESİMLER

		sayfa no
Resim 1	MgCl ₂ kalibrasyonu ve DNA moleküler ağırlık standardının görüntülenmesi	63
Resim 2	<i>P. aeruginosa</i> suşlarının <i>gyrA</i> gen bölgesinin PZR ürünlerinin ve DNA moleküler ağırlık standardının görüntülenmesi	65
Resim 3	Sitrat, Dekstroz, Laktoz, Maltoz, Mannitol ve Üre besiyerinde pozitif ve negatif sonuçlar	70

KISALTMALAR

dNTP	deoksinükleotid trifosfat
ddNTP	dideozi nükleotit trifosfat
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
gyrA	DNA gyrase subunit A
QRDR	Quinolone resistance determining region
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
Ile	İzolösin
Thr	Treonin
CIP	Siprofloksasin
OFX	Ofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitim süresi boyunca bilgi, tecrübe ve çalışma disiplinleri ile her zaman bana örnek olan ve bu tezin ortaya çıkmasında bana yardımlarını hiç esirgemeyen danışmanım Doç.Dr. Meltem Yalınay Çırak'a ve Yrd.Doç.Dr Doruk Engin'e, yetişmemde büyük emekleri geçen değerli hocalarıma ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa günümüzün önemli hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında başta gelen fırsatçı patojenlerden birisidir. Bu bakterilerin hastane ortam florasında endemik olarak bulundukları, hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan sıklıkla izole edildikleri bilinmektedir (29). *P. aeruginosa* minimal üreme koşullarında bile üreyebilmesi, doğada yaygın olarak bulunması, değişik virulans faktörlerinin olmasının yanı sıra, doğal olarak var olan ve buna ek olarak geliştirdiği direnç mekanizmaları ile oldukça önemli bir bakteridir (43). Pseudomonaslar yoğun bakım üniteleri, yanık üniteleri, mekanik ventilatörler, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invazif enfeksiyonlara yatkınlık oluşturmaktadır (22,42).

Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (6). Pseudomonasların hastane enfeksiyonlarında önemli hale gelmesi virulans faktörleri ve antibiyotik direnç sorunları nedeniyledir. Kang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında uygunsuz antibiyotik tedavisi, mortalite açısından bağımsız bir risk faktörü olarak ortaya konmuştur (28). Geniş spektrumlu antibiyotiklerin hastane içinde sıklıkla kullanılmaya başlaması nedeniyle gittikçe artan antibiyotik

direnci ortaya çıkmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında artan antibiyotik direnç oranları son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır.

Bu çalışmanın amacı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli örneklerden elde edilen nonfermentatif bakterilerin konvensiyonel olarak tür düzeyinde tiplendirilmesi ve *Pseudomonas aeruginosa* olarak saptanan bakterilerin agar dilüsyon yöntemiyle ofloksasin MİK (Minimal inhibitör konsantrasyon) değerlerinin çalışılması ve tüm *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ofloksasin direncinin, *gyrA* gen bölgesinin dizi analizi yöntemiyle moleküler olarak tanımlanmasıdır.

1 GENEL BİLGİLER

Pseudomonas cinsi bakterilerinin, insanlar için hastalandırıcı özellikte olan pek çok türü bulunmaktadır. Bunların en önemlisi *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* doğada, toprak ve sularda yaygın olarak bulunan, kısıtlı besin maddesi içeren ortamlarda bile yaşayabilen fırsatçı bir patojendir.

İlk kez 1850'de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmış ve *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Piyosiyanin izolasyonu 1862'de Lucke tarafından yapılmıştır (70).

1882'de Fransız eczacı Carle Gessard, yara akıntılarındaki mavi ve yeşil pigmentlere Pasteur'un kültür yöntemlerini uygulayarak *P. aeruginosa*'yı saf kültür halinde izole etmiştir. 1886 yılında Finkelstein adlı araştırmacı antemortem bir çocukta, 1889 yılında da Brill ve Libman adlı araştırmacılar yetişkin kanından *P. aeruginosa*'yı enfeksiyon etkeni olarak izole etmişlerdir. 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler patojen bir bakteri olarak tanımlamışlardır. Bakteri yıllar içinde hastane enfeksiyonlarında giderek önem kazanmaya başlamıştır (33,70). Kinolonlar antibiyotik seçeneğinin çok kısıtlı olduğu dirençli nonfermentatif bakteri enfeksiyonlarında önemli bir tedavi alternatifidir.

Kinolonlar 1960'lı yıllardan beri bilinen eski bir antibiyotik grubudur.

Grubun ilk üyesi antimalaryal ajan olan klorokininin saflaştırılması ile elde edilen nalidiksik asitten sonra 1980'li yıllarda florlanmış kinolonlar denilen yeni kinolonlar kullanıma girmiş ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bugün için en çok kullanılan kinolonların başında norfloksasin, enoksasin, ofloksasin, siprofloksasin, levofloksasin gelmekte bunları pefloksasin, lomefloksasin, sparfloksasin ve moksifloksasin izlemektedir. Klinafloksasin sitafloksasin , gemifloksasin ve gatifloksasin daha yeni türevler olarak denenmektedir.

1.1 SINIFLANDIRMA

Pseudomonas cinsi bakteriler *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alırlar. 1926 yılında Callifornia Üniversitesi'nde Dooren de Jong adlı araştırmacı, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. 1966 yılında da Buchanon, Holt ve Lessel adlı araştırmacılar *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine dayanarak sınıflandırmışlardır. Gilardi'nin fenotipik sınıflandırmasına göre pseudomonaslar yedi gruba ayrılır; fluorescent, stutzeri, alcaligenes, pseudomallei, acidovorans, facilis-delafieldii ve diminuta'dır (98)

1973 yılında Palleroni ve arkadaşları tarafından geliştirilen rRNA-DNA dizilim benzerliklerini temel alan genotipik sınıflandırmaya göre ise

pseudomonaslar beş gruba ayrılmıştır (23,24).

Tablo 1. *Pseudomonadaceae* ailesinin sınıflandırılması

Tablo 1 PSEUDOMONADACEAE ailesinin sınıflandırılması	
rRNA grup I	rRNA grup III
Fluorescent grup Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida	Acidovorans grup Comamonas acidovorans Comamonas terrigena Comamonas testosteroni
Stutzeri grup Pseudomonas stutzeri Pseudomonas mendocina CDC grup Vb-3	Facilis-delafieldii grup Acidovorax delafieldii Acidovorax facilis Acidovorax temperans
Alcaligenes grup Pseudomonas alcaligenes Pseudomonas pseudoalcaligenes Pseudomonas species grup 1	rRNA grup IV
rRNA grup II	Diminuta grup Brevundimonas diminuta Brevundimonas vesicularis
Pseudomallei grup Burkholderia mallei Burkholderia pseudomallei Burkholderia cepacia Burkholderia gladioli Burkholderia pickettii	rRNA grup V Stenotrophomonas maltophilia
	Nükleik asit homolojisi bilinmeyen Chryseomonas luteola Flavimonas oryzae Sphingomonas paucimobilis Pseudomonas-like grup 2 CDC grup WO-1

1.2 MORFOLOJİ

Pseudomonas aeruginosa düz veya hafif eğri, uçları yuvarlak, çoğunlukla bir uçlarında bir veya nadiren iki ya da üç tane kirpik bulunan ve kirpiklerinden dolayı çok hareketli çomaklardır. Hücrenin dış yüzey tabakasında kapsüle benzeyen glikokaliks tabakası bulunur. Bu tabaka alginik asit yapısında bir polisakkarittir ve başta D-mannuronik ve L-glusonik asitler olmak üzere poliüronik asitlerden oluştuğu saptanmıştır. Lipopolisakkarit 2-keto-3-deoksioktonik asit ve Lipid A içermektedir (63). Sporsuz ve fakültatif aerobiktir. Gram negatif ve 1.5-3 µm uzunluğunda ve 0.5-0.8 µm genişliğinde, çiftli veya kısa zincirler halinde görülen kolay boyanan bakterilerdir (7).

1.3 KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

1.3.1 Pigmentleri

Pseudomonas aeruginosa'nın bakteriyolojik tanısında önemli yer tutan piyosyanin, piyoverdin, piyorubin ve piyomelanin gibi pigmentleri vardır. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar ve oda ısısında etüve nazaran daha iyi meydana gelirler (20). Oluşturdukları bu pigmentler onlara seçici bir özellik kazandırmıştır (63).

Piyosyanin, floresans vermeyen fenazin türevinden mavi renkte kimyasal maddedir. *P. aeruginosa* bu mavi yeşil renk veren ekstrasellüler

pigmenti yaparak diğ er *Pseudomonas*'lardan ayırıcı özellik kazanır. Suda ve kloroformda eriyen bu pigment solunum yolunda bulunan siliyer hücrelerin fonksiyonlarını bozarak, toksik serbest radikallerin ortama yayılmasına ve doku hasarının artmasına yol açmaktadır (21). Ayrıca piyosiyanin inorganik fosfatın hücre içerisine alınmasında rol oynamaktadır. Piyosiyaninin antibiyotik etkisi nedeniyle *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Mycobacterium smegmatis*'e bakterisidal etki gösterir (22). *Brucella*, *Shigella*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella* ve *Vibrio* gibi mikroorganizmalara ise bakteriyostatik etkilidir. Piyosiyanin pigmentinin  retimi King A veya *pseudomonas* piyosiyanin agar kullanılarak artırılabilir. 37 C'de 5 gün inkübe edilen *P. aeruginosa* su larının %80'i piyosiyanin oluşturur.

Piyoverdin (fluorescein), fluoresans özellik taşıyan *Pseudomonas*'ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir. Bu pigmentler sideroforlardır ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler. Fe⁺³'in aktif transportunda rol oynar. Wood ışığında yeşil floresans verir. Suda erir ancak kloroformda erimeyen bu pigmentin üretimi için King B besiyeri kullanılır. King B besiyerinde klinik izolatların %70'i bu pigmenti oluşturur.

Piyorubin bazı *P. aeruginosa* su ları tarafından üretilen tüm pH derecelerinde parlak kırmızı renkte, suda çözünen ancak kloroformda

çözünmeyen bir fenazin pigmentidir.

Piyomelanin, klinik materyallerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %2-3'ünde görülen kahverengi siyah renkte suda eriyen bir pigmenttir. İçerisinde tirozin ve fenilalanin bulunan katı besiyerinde 24-48 saatte piyomelanin oluştururlar.

P. aeruginosa kültürlerinde ; 1-hidroksifenazin, fenazin 1 karboksilat, dihidroksifenazin 1 karboksilat, piyoselin, klororafin, oksiklororafin, klor içeren piyeluteorin gibi pigmentlere de rastlanabilir. Bu pigmentlerin oluşumu kültür koşullarına bağlı olup mutasyonla bu özellikler kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Enzim aktivitelerini araştırmak için kullanılan besiyerleri, 30°C'de inkübe edilmelidir.

1.3.2 Koloni Formu

Pseudomonas aeruginosa uygun besiyerlerinde 10-44°C'de üreyebilir ancak optimum 35°C'de ve hafif alkali ortamda ürer. İzolasyon için besiyerleri 24-48 saat inkübe edilmelidir. 4°C'de üreyemezler. *P. aeruginosa*'nın 42°C'de arka arkaya üç pasajda üreyebilmesi *P. fluorescens*'den ayırt edici bir özelliğidir (22). Sıvı besiyerinde yüzeyde zar meydana getirerek yoğun ve homojen bir üreme gösterir ve zarın hemen altında mavi yeşil pigment görülür.

Katı besiyerinde *P.aeruginosa* değişik koloni formları gösterir. Bunlardan Tip I koloni şekli, 2-3 mm çapında yuvarlak, yassı, mat yüzeyi olan, orta kısmı şişkin, beyaz renkli, fluoresans özellik gösteren ve besiyerinin her tarafına yayılan mavi yeşil renkte pigmentleri görülen kolonilerdir. Bu tip kolonilere daha çok klinik örneklerde karşılaşılr. Tip II koloniler çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen ve Tip I kolonilere göre daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz koliform kolonilerine benzeyen kolonilerdir. Tip III koloniler mukoid görünümlü kolonilerdir ve bunlar bir dış mukoid polisakkarit alginatı üreten, özellikle kistik fibrozisli hastaların solunum yollarından izole edilen *P. aeruginosa*'ların oluşturdukları R kolonilerdir. *P.aeruginosa*'da mukoid morfortip, süşun aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) üretmesine bağılı olarak ortaya çıkmaktadır. Aljinat polimannuronik poliguluronik asitten oluşan bir heteropolisakkarit olup, kistik fibrozis'te kötü prognozu gösteren bir antijendir (28).

Aljinat biyofilm aynı zamanda antimikrobiyaller için polianyonik bir bariyer oluşturur ve ilaç direncine yol açmaktadır. Özellikle β -laktam antibiyotiklerin hücre içine penetrasyonunu önleyerek tedaviyi güçleştirmektedir (28,30).

P. aeruginosa'nın virulans faktörü hemolizinleri olan kökenleri %5 oranında koyun kanı içeren besiyerinde beta hemoliz yapan, düz, basık, kenarları pürtüklü buzlu cam görünümünde koloniler yaparlar. Mc Conkey

besiyerinde mavi yeşil koloniler oluştururlar. Kültürde triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak karakteristik bir aromatik meyve kokusu vardır.

1.3.3 Biyokimyası

P. aeruginosa'nın oksidaz ve katalaz testleri pozitifdir. Diğer Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden oksidaz testinin pozitif olmasıyla ayrılır. *P. aeruginosa* zorunlu aeroptur ancak ortamda nitrat varsa bunu terminal elektron alıcısı olarak kullanırsa anaerob ortamda da üreyebilirler. Toprakta ve hastane ortamlarında canlılığını koruyabilmesi nitratları kullanabilmesi ile açıklanır. *P. aeruginosa* yaklaşık 80 kadar organik bileşiği kullanabilme özelliği vardır. Glikozu ve bazı karbonhidratları oksidatif yolla parçalayıp asit yaparlar. Laktoz ve sakkarozu kullanamaz, nişastaya etki edemezler. Sitrat pozitif olup metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatif sonuç verir. İndol ve H₂S yapmazlar. Nitratı nitrite çevirip lizin ve ornitini dekarboksile edemezler. Üreyi amonyağa çevirirler. Jelatin ve koagüle plazmayı eriterek parçalarlar. Tetrazolium tuzlarını ve seleniti redükte edip metilen mavisini ve prontosilin rengini giderirler (25,26,27).

1.4 PATOGENEZ

P. aeruginosa sağlıklı insanlarda saprofit olarak bulunur ve hastalığa nadiren sebep olur. Yanık, kanser kemoterapisi, HIV enfeksiyonu, n6tropeni gibi normal savunma mekanizmalarının bozulması, uzun süreli geniş spekturumlu antibiyotik kullanımıyla, 6riner kateter, endotrakeal ent6basyon gibi savunma mekanizmaların bozulduğu durumlarda enfeksiyona neden olurlar (31). Buna "oportunistik aderans" adı verilir. Bu pseudomonas cinsi bakteri enfeksiyonlarının patogenezinde 6nemli bir başlatıcı adımdır.

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak 6zere 6ç aşamada gelişir. Cilt ve mukoza y6zeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında vir6lans fakt6rleri, konağın immun direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları 6nemli yer tutar. Hastalık herhangi bir devrede durabilir. 6rneğin enfeksiyon kolonizasyon aşamasında kalabilir ya da sistemik enfeksiyona kadar ilerleyebilir (32,33).

1.4.1 Virulans Fakt6rleri

Pseudomonas aeruginosa'nın vir6lansından sorumlu 6eşitli yapısal ve h6cre dışı enzimleri bulunmaktadır. Piluslar, polisakkarid kaps6l,

lipopolisakkarit, ekstrasellüler proteaz, hemolizin, ekzotoksin A, ekzoenzim S, nöraminidaz, sitotoksin, piyosiyenin ve enterotoksin gibi pek çok virulans faktörler üretir (22).

Pili ve fimbrialar, konak epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan sialik asitsiz gangliosid (GM-1) reseptörlerine tutunmayı sağlar. Pililer en önemli adherans faktörüdür (32).

Polisakkarid kapsül; glikokaliks, ekzopolisakkarit ya da aljinat olarak da adlandırılan bu kapsüller yapı, mannuronik ve glukuronik asitten oluşur. Bu karbonhidrat bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir ve konak savunmasından bakteriyi korur. Kapsül hem adezyon faktörü hem de antifagositer olarak işlev görür ve immünojeniktir. Müsin salgılanması, bakterinin fagositozdan korunması, aminoglikozidler başta olmak üzere antibiyotiklerin bakterisidal aktivitesinin azalması ve biyofilm tabakanın oluşması gibi işlevleri vardır. İn vitro çalışmalarda ekzopolisakkaritlerin varlığı katı besiyeri ortamında mukoid koloni, sıvı besiyeri ortamında ise viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (32).

Biyofilm özelliği gösteren ekzopolisakkaritler, bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler. Ayrıca biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlanmasında işlev görür. Kistik fibrozisli hastalarda *P.aeruginosa* kolonizasyonu kronik hale geldikçe suşun mukoid morfolojiye

dönüştüğü, lipopolisakkarit yapıdaki O antijenlerini ve flajellerini kaybettiği ve serum duyarlı hale geldiği saptanmıştır. Mukoid morfotip, suşun aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) üretmesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır ve sıklıkla kistik fibrozisli hastaların balgamlarından izole edilir. Kistik fibrozis'de mukoid fenotipe *P. aeruginosa* ile kolonizasyon geliştiğinde, agresif antibiyotik tedavisine rağmen bu suş akciğerlerden temizlenememektedir. Aljinat varlığında *P.aeruginosa* biofilm matriks içinde mikrokoloniler oluşturmaktadır. Aljinat hem kemotaksisi inhibe etmekte, hem de bakteri yüzeyinde veya aljinat biyofilm içinde toplanan opsoninler bir ölçüde saklı kaldıklarından fagositik hücreler tarafından tanınamamakta böylece fagositoz da önlenmektedir (38). Aljinat biyofilm aynı zamanda antimikrobiyal ajanlar için polianyonik bir bariyer oluşturmakta böylelikle ilaç direncine de yol açmaktadır. Özellikle β -laktam grubu antibiyotiklerin hücre içine penetrasyonunu önleyerek tedaviyi güçleştirmektedir.

Lipopolisakkarit; Araşidonik asit metabolitlerinin üretimini stimüle ederek ateş, şok, dissemine intravasküler koagülasyon ve metabolik değişikliklerle karakterize septik şok sendromuna neden olur (32). Lipopolisakkarid yapısındaki polisakkarid O yan zincirini kaybeden suşlar, komplemana duyarlı hale gelirler ve invazif enfeksiyon, bakteriyemi oluşturabilme yeteneklerini kaybederler (21).

Ekstrasellüler proteazlar (Elastaz-alkalin proteaz) : Elastaz enzimi

elastin içeren doku hasarından sorumludur. IgG ve IgA yıkımı, kompleman parçalanması, interferon gamma ve tümör nekrotizan faktör (TNF)'nin etkisizleştirilmesi ile birlikte akciğer parenkim hasarına ve pseudomonas sepsisinin karakteristik deri bulgusu olan ektima gangrenozumuna neden olur. Nötrofil kemotaksisini engeller. Bakterilerin yayılımını artırır. Kronik pseudomonas enfeksiyonlarının çoğunda elastaza karşı antikor olduğu saptanmıştır. Alkalın proteaz proteinleri sindirerek doku nekrozunu başlatan güçlü bir antikoagulan etkiye sahip tümör nekrotizan faktör (TNF)'inde içinde olduğu çok sayıda sitokini inaktive eden bir enzimdir. Her iki proteaz deride, akciğerde ve kornea'da nekrozlar yapar (27,32,41).

Hemolizinler; *P. aeruginosa* iki çeşit hemolizin yapar. biri ısıya duyarlı fosfolipaz C, diğeri ısıya dayanıklı bir glikopeptiddir. Fosfolipaz C sürfaktantın bir bölümü olan fosfatidilkolini parçalayarak, pulmoner atelektazinin gelişmesine neden olurlar. Isıya dayanıklı glikopeptid olan rhamnolipid ise solunum yollarındaki mukosiliyer aktiviteyi inhibe eder. Siliyer aktivitenin azalması ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının oluşmasından sorumludur (32,41). Bu iki hemolizin sinerjik hareket ederler, lipidleri ve lestini parçalayarak doku invazyonuna yardımcı olurlar. Protezlar gibi hemolizinler de nekroz yaparak, enfeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardım eder (21).

Ekzotoksin A, 613 aminoasitten oluşan hücre dışı bir enzimdir.

P.aeruginosa'nın en önemli virölans faktörüdür ve adenosin difosfat (ADP) riboziltransferazdır. *P. aeruginosa*'nın klinik izolatları tarafından üretilen difteri benzeri bir toksindir. Memeli protein sentezini nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'ın adenosin difosfat(ADP) riboz parçasını elongasyon faktör 2 (EF 2) ile kovalent bağlanmasını sağlayarak, polipeptid uzatma basamağında bu faktörün katalize etme özelliğini inaktive eder (39). Lokal nekroza ve enfeksiyonun sistemik yayılmasına neden olur. Bakterinin ekzotoksin A salgılamayan mutant suşları, salgılayanlara oranla daha hafif şiddette hasara neden olmaktadır(21,32).

Ekzoenzim S; Çift yönlü bir sitotoksindir. Ekzoenzim S'in karboksic ucu, kültür hücrelerinde eksprese olabildiğinden Ekzotoksin A gibi sitotoksik etkisi olan ADP riboziltransferaz zincirinden oluşur (40). Guanozin trifosfat bağlayan proteinleri ribolize eder. Ekzoenzim S, *P. aeruginosa*'nın tip III sekresyon aygıtı denilen transmembran proteinleri dizisi yoluyla bakteriyel sitozolden konakçı hücre sitoplazmasının içine doğrudan sunulur. Bu süreç doğrudan hücre temasını gerektirir (39). Bakterilerin yayılmasını ve invazyonunu kolaylaştırır ve virölansı yüksek suşlarda güçlü nekrotik etkisi vardır (32). Spesifik olarak yanık yaraları üzerinde ve akciğerde enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olur.

Nöraminidaz, *Pseudomonas* cinsi bakteriler siyalik asidin olmadığı gangliosid reseptörlerine öncelikli bağlanırlar. Nöraminidaz da siyalik asidi uzaklaştırarak pilinin GM-1 reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır(32).

Sitotoksin (lökosidin): Bu 25.000 mol ağırlığında bir proteindir. Ökaryotik hücelere sitotoksik etkisi vardır. Sitopatik etkisi nedeniyle lökosidin olarak adlandırılır. Nötrofil ve lökositlerin fonksiyonlarını bozar, akut akciğer hasarının patogeneğinde rol alır(21).

Piyosiyenin; Solunum yolunda bulunan siliyer hücrelerin fonksiyonlarını bozarak, toksik serbest radikallerin ortama yayılmasına ve doku hasarının artmasına yol açar. Akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarından sorumludur(21,32).

Enterotoksin; Normal gastrointestinal aktivitenin kesintiye uğramasına neden olarak diyareye yol açar(32).

1.4.2 Plasmidleri, bakteriyosinleri, fajları

Pseudomonaslarda çok sayıda plazmid bulunmaktadır. Bakterilerin içinde ve kromozomların dışında bulunabilen DNA yapısında, içinde bulundukları bakterilere bazı özellikler kazandıran ve bu özellikleri genetik olarak kontrolü altında tutan 4-400 kilobazlık elementlere plazmid denir. Plazmid çift iplikli, kromozomdan bağımsız olarak çoğalan, kromozom dışı genetik elementlerdir. Bunlar metabolizma ile ilgili olaylarda ve çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmada rol alırlar. Antibiyotik direncinin hızla yayılmasına yol açabilirler. Birçok *Pseudomonas* türü, yüzlerce çeşit organik bileşiği karbon kaynağı olarak özellikle toluen, oktan gibi zehirli

organik bileşikleri kullanmaktadır. Bu metabolik yetenek, degradasyon plazmidleri tarafından sağlanır. Her bir plazmid, bu bileşikleri yıkmaya yarayan bir veya daha fazla metabolik yolda görevlidir. Bu tipteki bazı plazmidler, bakteriye sentetik bileşikleri yıkma yeteneği kazandırır.

Pseudomonaslarda direnç plazmidleri bulunmaktadır. Enterik bakterilerden ya da diğer pseudomonas suşlarından kazanılan direnç plazmidleri ile çoğu Pseudomonas çoklu direnç özelliğine sahiptir. *Pseudomonas aeruginosa*, konakçı sınırı geniş plazmidler olarak adlandırılan Inc P1 inkompatibilite gruplarındaki self transmissible R plazmidleri taşır. Bu plazmitler çok sayıda bakteri türüne transfer edilebilir. Plazmidizal kinolon direnci ilk kez 1998 yılında bildirilmiş ve plazmid üzerinde kodlanan Qnr adlı bir proteinin DNA girazı kinolonun etkisinden koruyarak dirence yol açtığı gösterilmiştir. Bu geni içeren plazmid 18 ülke ve ABD'de 24 eyaletten 350 gram negatif bakteri incelendiğinde sadece ABD'de Alabama Üniversitesinde 1994 yılında 6 ay içinde izole edilen suşlarda bulunmuştur (99). *Pseudomonas aeruginosa* suşları bakteriyosinler üretir ve bunlar aynı türün diğer suşlarını öldürücü etkiye sahiptir. *P. aeruginosa* bakteriyosinleri pyosin adını alır. Brandy'in 1967 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre *P. aeruginosa* 'nın bakteriyosinleri S ve R tipindedir. S tipi şekilsiz görünümlü ve proteolitik enzimlere duyarlı, R tipi faj komponentleri yapısında ve proteolize duyarlı değildir. *P. aeruginosa* pyosini kromozomal genler tarafından spesifiye edilir.

Bakteriyosin tiplendirilmesinde, duyarlı indikatör suşlara karşı bilinmeyen bir organizmanın ekstraktı ya da bilinen bakteriyosinlere karşı bilinmeyen suşun duyarlılığı denenir. *P. aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosin tipi belirlenmiştir.

P. aeruginosa'da birçok litik faj identifiye edilmiştir ve bu fajların morfolojik çeşitliliği önemlidir. Aynı O grup *P. aeruginosa* suşları arasında ayırım yapmak için faj tiplendirme tekniği kullanılır. Faj tiplendirmesinde test suşu üzerine bilinen faj süspansiyonları damlatılarak inkübasyondan sonra lizis saptanır.

1.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*'da "çoğunluğu algılama-quorum sensing"

Kelime anlamı olarak "quorum sensing" hücre yoğunluğuna bağımlı gen ekspresyonunun kontrolü olarak açıklanabilir. Bu tür iletişimin esası, bakteri hücresinin otoindükleyici olarak işlev gören bazı sinyal molekülleri sentezleyerek çevresinde bulunan aynı türden diğer bakterilerin sayısını/yoğunluğunu izlemesine dayanmaktadır (58). Hücre dışı virulans faktörlerinin çoğunun üretimi ve salınımı quorum sensing (QS) olarak adlandırılan bir hücre hücre sinyal sisteminin kontrolündedir. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi tarafından salınan lakton ve diğer sinyal molekülleri yoluyla bakteriyel popülasyon , çevresini algılama,

iletişim ve kendi yoğunluğunu ayırt etme özelliğine sahiptir. Bu düzenleyici sistem hücre yoğunluğuna bağlı biçimde koordine olarak *P. aeruginosa*'nın hücre dışı virölans faktörlerini üretmesine izin verir ve patojene karşı savunma mekanizmaları üstünde önemli avantaj sağlar (39).

QS molekülleri *Pseudomonas* virölans genlerinin ekspresyonunu artırmalarına ilave olarak, konağın immün yanıtını da etkileyerek daha invaziv enfeksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (37). Bakteri hücresinde virölans genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virölansının azaltılmasının enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği kabul edilmektedir (58).

1.4.4 Epidemiyolojisi

Pseudomonas aeruginosa çoğunlukla toprak, su ve organik maddeler gibi kısıtlı besin maddeleri bulunan ortamlarda yaşıyabilen fırsatçı bir patojen bakteridir. Özellikle nemli ortamlarda kolaylıkla üreyebilir. Hastane ortamlarında ki solunum cihazları, endoskoplar, enfüzyon cihazları, damar içi kataterler, lavobalar, duşlar, paspaslar, temizlik solüsyonları ve çiçekler olası enfeksiyon kaynaklarıdır (21). Farklı fiziksel koşullara çok kolay uyum sağlar. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının çoğu hastaneden kazanılır. İnsanların normal florasında da bulunabilir.

Hastane dışındaki veya hastaneye başvuran kişilerde düşük oranda bulunur. Deride % 0-2, burun mukozasında %0-3, boğazda % 0-6, dışkıda % 2.6-24 arasında bulunur. Yoğun bakım üniteleri, yanık üniteleri, mekanik ventilatörler, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invazif enfeksiyonlara yatkınlık oluşturmaktadır(22,42).

1.4.5 Klinik

Pseudomonaslar yüzeysel deri enfeksiyonlarından sepsise kadar farklı klinik tablolara sebep olabilen, yüksek morbidite ve mortalitesi ile önemli bir insan patojenidir (44). Pseudomonaslar öncelikli olarak nozokomiyal patojen olup, sağlıklı insanda nadiren hastalık oluşturur. Özellikle hastane ortamında, bağışıklık ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilir. Pseudomonasların en sık neden olduğu enfeksiyonlar, nötropenik hastalarda, mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda ve kistik fibrozlu hastaların akut alevlenmelerinde görülen pnömoniler, nötropenik hastalar ve HIV enfeksiyonunu da içeren bağışıklığı kırılmış hastalardaki bakteriyemiler, yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonları, diyabetik hastalarda ve yüzücülerin kulağında gelişen malign otitis media, santral sinir sistemi enfeksiyonları, kontakt lensler ile

endoftalmit ve keratit, idrar yolu enfeksiyonları, ortopedik enfeksiyonlar, intravenöz ilaç kullananlarda doğal kapak endokarditi ve prostetik kapak endokarditi olarak sayılabilir.

1.4.5.1 Solunum Yolu Enfeksiyonları

Pseudomonas'a bağlı akciğer hastalıkları en fazla kronik akciğer hastalarında ve bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde görülmektedir. Primer pnömoni, duyarlı hastalarda kolonize olan *P. aeruginosa*'nın aspirasyonu ile gelişir ve ventilatörle ilişkili pnömonilerde önemli bir etkindir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu nozokomiyal pnömonilerde mortalite oranları oldukça yüksektir.. Brewer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mortalite oranı %38 olarak bildirilmiştir (68). Toplum kökenli pnömonilerde ise nadiren etken olarak izole edilir. Bakteriyemik pnömoni ise solunum yolu enfeksiyonu olarak başlar fakat primer pnömoninin aksine tipik olarak nötropeni, çok geçmeden kan akımı invazyonu ve akciğerde lezyonlar oluşturan metastatik yayılım gösterir. *P.aeruginosa*'ya bağlı alt solunum yolu enfeksiyonları çoğunlukla aljinat üreten mukoid türler ile olur (21,22).

1.4.5.2 Bakteriyemi

Kaynağı bilinmeyen ya da ekstrasvasküler bir kaynağın varlığında gerçekleşebilen hastane kaynaklı bakteriyemilerin en sık nedenlerinden

birisi *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* bakteriyemileri oldukça ağır ve özellikle bağışıklığı kırılmış hastalarda mortalitesi yüksek enfeksiyonlardır. Hastanın yaşı ve enfeksiyonla ilişkili faktörlere bağlı olmak üzere mortalite oranları %20-70 arasında değişmektedir. Wisplinghoff ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada nozokomiyal *P. aeruginosa* bakteriyemilerinde mortalite oranı %36 olarak saptanmıştır. Nötropenik olgularda mortalite oranı %48, nötropenik olmayan hastalarda ise %31 olarak bulunmuştur (68). Toplum kökenli *P.aeruginosa* bakteriyemisi ise oldukça nadir görülmektedir (21,22).

1.4.5.3 Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın sebep olduğu deri enfeksiyonları birincil olarak ektima gangrenozum, subkütan nodüller, veziküller, büller, selülit kapsar. İkincil deri lezyonları ise nötropeni, yanık, dekübit ülserleri, nemli ortamlara maruz kalma esnasında gelişebilir. Yanık yara sepsisi de *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu ciddi bir komplikasyondur.

1.4.5.4 Kulak Enfeksiyonları

P. aeruginosa normal kulakta nadiren bulunmasına rağmen yaralanma, maserasyon, inflamasyon ve nem varsa dış kulak yolunda sıklıkla yerleşir. İyi seyirli akut enfeksiyonlara ve malign eksternal otit gibi kronik ciddi enfeksiyonlara da neden olabilir. *P.aeruginosa* kronik süpüratif

otitis media'lı çocuk ve yetişkinlerin orta ve dış kulak yolundan en sık izole edilen bakteriyel patojendir (31,47).

1.4.5.5 Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları

Genellikle immünsüpresyon ve lokal savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlarda gelişir. *P. aeruginosa*, santral sinir sistemine malign eksternal otit veya sinüzit gibi lokal bir odaktan, direkt kafa travmaları ve cerrahi sırasında direkt inokülasyon ile ya da endokardit gibi uzak bir odaktan hematogen yol ile ulaşabilir. Enfeksiyon menenjit ya da beyin absesine neden olabilir.

1.4.5.6 Göz Enfeksiyonları

Bakteriyel keratit veya korneal ülser ve endoftalmit neden olur. *P.aeruginosa* kornea için en önemli patojen olup 24-48 saat içinde keratit oluşturmaktadır. Keratit oluşumunda ki risk faktörleri, uzun süreli yumuşak lens kullanımı, yanık yaraların bulunması, uzun süre komada kalma,oküler ışın tedavisi ve AIDS'dir.

1.4.5.7 Üriner Sistem Enfeksiyonları

P. aeruginosa ile üriner sistem enfeksiyonları çoğunlukla kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenli ve iatrojeniktir. Üretradan komşulukla olabileceği gibi primer bir odaktan

bakteriyemi ile de gelişebilir.

1.4.5.8 Ortopedik Enfeksiyonlar

En çok eklem protez ameliyatlarının komplikasyonu olarak karşımıza çıkarmaktadır. Ayrıca pelvik genitoüriner cerrahi sonrası, araç içi veya dışı trafik kazaları sonucu oluşan açık kırıklar, komplike idrar yolu enfeksiyonları, diyabetik ayak ülserleri ve delici kesici yaralanmalar ile birlikte de görülebilir.

1.4.5.9 Endokardit

Protez kapak endokarditine sebep olduğu gibi enjeksiyon ilaç kullananlarda doğal kalp kapaklarını da infekte edebilir. Protez kapak endokarditi hızlı seyirli, prognozu kötü bir enfeksiyondur.

1.4.5.10 Gastrointestinal Enfeksiyonlar

Kemoterapi alan nötropenik hastalarda *P.aeruginosa* bakteriyemisinin gelişiminde ana giriş yolu gastrointestinal sistemdir. Enfeksiyon en çok gastrointestinal kanal boyunca görülebilmekle beraber en sık çekum ve rektumu tutar. Yeni doğan çocukların ölümüyle sonuçlanan epidemik ishale neden olur.

1.4.5.11 AIDS Hastalarında Enfeksiyon

P. aeruginosa enfeksiyonları AIDS hastalarında gözlenebilir. Birçok

vakada enfeksiyon toplum kökenlidir. Bakteriyemi sıklıkla gözlenir ve enfeksiyonların en sık tespit edilen giriş yerleri akciğerler ya da damar içi kateterlerdir.

1.5 Antimikrobiyal Direnç

Geniş spektrumlu pek çok antibiyotiğin yaygın olarak kullanılması sonucu *Pseudomonas aeruginosa*'da antibiyotik direnci günümüzde önemli bir sorun oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç göstermekte ve bu nedenle etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır (29). Toplumdan kazanılmış *P.aeruginosa* izolatları genellikle antipseudömonal penisilinlere (tikarsilin ve piperasilin), aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), siprofloksasine, sefoperazona, seftazidime, meropeneme ve imipeneme duyarlıdır. Antistafilokokkal penisilinler, sulbaktam-ampisilin, ampisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asid, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, trimetoprim sulfametaksazol, nalidiksik asid'e doğal olarak dirençlidir. *Pseudomonas aeruginosa* genetik olarak birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra kemoterapi sırasında da çoğul dirençli suşlar ortaya çıkabilmektedir (45,46). Özellikle yoğun bakım birimlerinde hemen her antibiyotiğe yüksek oranda direnç gösteren ve çoklu ilaç direnç sorunu taşıyan önemli nozokomiyal bir patojendir.

Karbapenemler dahil beta-laktamların çoğu, aminoglikozitler ve kinolonlara karşı direnç %40'dan fazladır. *P.aeruginosa*, piperasilin tazobaktama bile %35 oranında direnç göstermektedir. Bazen panrezistan kökenlerle karşılaşılmaktadır (48).

Bakterilerin antimikrobik ilaçlara karşı gösterdiği biyokimyasal direnç mekanizmaları üç grup altında toplanabilir.

1. İlacın hedefinde değişiklik oluşturulması
2. İlacın enzimatik inaktivasyonu
3. Hücreye giren veya biriken ilaç miktarının azaltılması
 - a) Permeabilitenin azaltılması
 - b) Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması

Bakteriler bu mekanizmalardan bir kaçını aynı anda kullanarak farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotiklere direnç kazanabilmektedir.

1. İlacın Hedefinde Değişiklik Oluşturulması

Hedefteki değişiklik sonucu direnç gelişimi en sık görülen direnç mekanizmalarından biridir. İlaçların bağlandığı hedef bölgeler çeşitli enzimler ve ribozomlardır. Bu hedeflerde tek bir mutasyon sonucu ilaca bağlanma özelliği düşük, yeni bir hedef oluşumu meydana gelir. Ribozomal hedefte değişiklik ile ilgili direnç en fazla makrolid grubu antibiyotiklerde gözlenmektedir. Hedef yapısındaki değişiklikler, beta

laktam, kinolon, glikopeptid, makrolid, tetrasiklin ve rifampisine direnç gelişiminde önemlidir.

Bazı bakteriler hedef değişimlerinden farklı olarak ilaca duyarlı hedefe gereksinimi ortadan kaldırarak yeni bir metabolik yol geliştirebilirler. Örneğin, Trimetoprim/sülfametoksazol kombinasyonu, bakterinin yaşamsal önemi olan kromozomun replikasyonunda rol oynayan enzimleri inhibe eder. Bakteriler folat sentez etme yerine ortamdan hazır folat alarak alternatif bir metabolik yol kullanabilmektedir.

2. İlacın Enzimatik İnaktivasyonu

İlacın enzimatik inaktivasyonu antibiyotiği parçalayan ya da modifiye edici enzimler oluşturarak meydana gelir. Gram negatif ve gram pozitif bakteriler antibiyotikleri parçalayan enzimler sentezler. Bu grupta beta laktam grubu antibiyotikleri parçalayan beta laktamazlar, aminoglikozidlerin yapısını modifiye eden asetilaz, adenilaz ve fosforilaz enzimleri, kloramfenikölü parçalayan kloramfenikol asetil transferaz ve eritromisini inaktive eden eritromisin esteraz bulunur (45,69).

3. Hücreye Giren veya Biriken İlaç Miktarının Azaltılması

İç ve dış membran permeabilitesindeki değişikliklere bağlı olarak ya ilacın hücre içine alınımındaki azalmadan ya da hızla dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanmaktadır.

a) Permeabilitenin azaltılması

Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için bakteri hücrelerine penetre olması gerekmektedir. Beta laktam antibiyotikler sitoplazmik zarın dış yüzeyine, aminoglikozidler ise hücre içine ulaşması gereklidir. Gram negatif bakterilerde antibiyotiklerin hücre içine girmesi, dış membrandaki porinler aracılığı ile olur. Mutasyonlar ile dış membran porinlerindeki değişim sonucu geçirgenlik azalır ve dirençli suşlar ortaya çıkar. Örneğin, *P.aeruginosa*'da OprD porindeki değişim sonucu karbapenem direnci ortaya çıkar. Dış zar geçirgenliği kinolon ve aminoglikozid direncinde önemli rol oynar (45,69).

b) Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması

Antimikrobiyallerin hücre dışına atılımını sağlayan aktif pompa sistemi ilk kez Tetrasiklinler için belirlenmiştir. Aktif dışa pompalama sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasını ve antimikrobiyallerin de dışarı atılmasına neden olur. Pseudomonaslarda beta laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmaları aktif dışa pompalama sistemleridir. Günümüzde aktif dışa pompalama sistemleri en iyi *P. aeruginosa* 'da araştırılmıştır (48, 49).

P. aeruginosa'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM aktif dışa pompalama sistemleri tanımlanmıştır. MexAB-OprM aktif dışa pompalama sistemi en iyi tanımlanmış olanıdır. Aktif pompalama

sistemi ile kazanılan direnç çoğul direnç genine sahip fenotipler oluşturur. MexAB-OprM aktif pompalama sistemi imipenem hariç tüm beta laktamlara ve kinolonlara direnç oluşturmaları ile önemlidir. MexCD-OprJ aktif pompalama sistemi 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN aktif pompalama sistemi karbapenemlerde de dirence neden olabilir (48,49).

Diğer Ajanlara Direnç

Özellikle yoğun bakım birimlerinde hemen her antibiyotiğe yüksek oranda direnç gösteren ve çoklu ilaç direnç sorunu taşıyan *P.aeruginosa* pek çok antiseptik ve dezenfektana karşı da yüksek seviyeli direnç gösterir. Bu sorun ilk kez 1950'lerde birkaç hastaneden seyreltilmiş sulu benzalkonyum klorür solüsyonunda *Pseudomonas* kontaminasyonunun bildirilmesiyle tanımlanmıştır. Bazı suşlar, benzalkonyum klorür, klorheksidin, setrimid, fenolik dezenfektanlar, iyodofor dezenfektanlar ve kuvaterner amonyum dezenfektanların rutinde kullanılan dilüsyonlarına dirençli oldukları saptanmıştır. Poloksamer-iyot ve povidon-iyot içeren ticari preparatları *P.aeruginosa* kontamine edebilmektedir.

KİNOLONLAR

İnsanoğlunun bakterilerle olan savaşında son yılların en gözde antibakteriyel ajanları arasında yer alan kinolonlar; aslında 1960 'lı yıllardan beri bilinen eski bir antimikrobik grubudur. Bu grubun ilk üyesi, antimalaryal bir ajan olan klorokinin saflaştırılması esnasında elde edilen ara üründen üretilen yapısında flor içeren nalidiksik asittir . Nalidiksik asit dar spektrumlu ve yan etkisinin fazla olması nedeniyle kullanımı gram negatif bakterilerin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonları ile sınırlı kalmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda nalidiksik asite karşı bakterilerin kolay direnç oluşturmaması ve bu bileşiğin özellikle plazmid kökenli dirence duyarsız oluşu dikkatleri tekrar bu grup üzerine toplamıştır. Kinolonların esas yapılarını 1. pozisyonunda nitrojen ve 4. karbona çift bağla bağlı oksijen içeren ikili halka oluşturur. Bunlardan birinci halkanın 3. karbonuna karboksilik asit bağlıdır. 6. pozisyonda bazılarında 8. pozisyonda flor vardır, 7. karbona piperazinil halkası bağlıdır (56). Özellikle 1980'li yıllardan sonra geliştirilen florokinolonlar veya 4-kinolonlar adı verilen yeni kinolon türevleri nalidiksik asite göre daha geniş etki alanı, daha iyi in vitro etkinlik ve daha iyi farmakokinetik özellikleri ile çok değişik enfeksiyonların tedavisinde yaygın ve etkin olarak kullanılmaya başlanmış yeni ajanlardır. Kinolonlar arasındaki antibakteriyel etkinlik, farmakokinetik ve bazı yan etkiler yönünden farklılıklar kimyasal yapılarındaki

farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Kinolonlar sentez edildikleri sıraya ve antimikrobiyal etkinliklerine göre dört gruba ayrılır (51).

Tablo 2. Kinolonların sınıflandırılması

1.Kuşak	2.Kuşak	3.Kuşak	4.Kuşak
Nalidiksik asit	Siprofloksasin	Levofloksasin	Moksifloksasin
Oksolinik asit	Ofloksasin	Grepafloksasin	Gatifloksasin
Sinoksasin	Pefloksasin	Sparfloksasin	Gemifloksasin
Piromidik asit	Norfloksasin	Temafloksasin	Sitafloksasin
Rosoksasin	Enoksasin		Clinafloksasin
Pipedimik asit	Fleroksasin		Travofloksasin
Flumekin	Lomefloksasin		

Etki Mekanizması

Kinolonlar bakteri hücresinde DNA sentezini bozarak etkilerini gösterirler ve konsantrasyon bağımlı bakterisidal etkilidirler. Çok yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini inhibe ederler. Hücre içine basit difüzyon ile giren kinolonların temel hedefleri, DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve bir ATP bağımlı tip II DNA topoizomeraz olan DNA giraz enzimi ve DNA replikasyonu sonrasında hücre bölünmesinden sorumlu Topoizomeraz IV enzimleridir. DNA giraz ilk kez 1976 'da Gellert ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. DNA giraz *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki adet A ve iki adet B alt ünitesinden oluşan heterotetramer yapıda bir proteindir. A alt birimi 97.000 dalton, B alt birimi 90.000 dalton ağırlığındadır. DNA giraz molekülünün toplam ağırlığı 374.000 daltondur. Kinolonların ikincil hedefi Topoizomeraz IV ise iki parC ve iki parE alt birimlerinden oluşur. par C alt birimini parC geni, parE alt birimini parE geni kodlamaktadır. parC 75 kDa, ParE 70 kDa'dur. Her iki enzim de büyük homoloji gösterir. *gyrA* ve parC DNA'yı keser, *gyrB* ve parE bu reaksiyon için enerji sağlar. DNA giraz kromozomal çift sarmallı bakteri DNA'sında reversibl kesme ve tekrar bağlama fonksiyonu ile DNA'da negatif kıvrımlara neden olur ve DNA molekülünün boyunu küçülterek hücre içine sığdırır. Topoizomeraz IV enzimi ise DNA replikasyonunun terminal döneminde ana DNA'ya bağlı yavru DNA'nın kopmasından sorumludur. Kinolonlar enzim-DNA

kompleksine bağlanıp bu kompleksin enzim-DNA-kinolon üçlü yapısı şeklinde donmasına yol açarak, bir diğer DNA sarmalının geçmesi için kesilmiş DNA zincirinin tekrar birleştirilmesini engellerler. Bu kompleks bakteri için bir zehir etkisi göstererek DNA sentezini durdurur (52,53). Florokinolonların hedefi olan enzimler ve direnç profilleri türler arasında değişkenlik göstermektedir. Gram negatif bakterilerde kinolonların ilk hedefi DNA giraz, gram pozitif bakterilerde Topoizomerez IV enzimidir.

Direnç Mekanizmaları

Kinolonlara karşı plazmid yoluyla direnç gelişimi çok görülmemektedir. Kromozomal mutasyonla direnç gelişebilmekte ve iki farklı temel mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bunlar, hedef enzimde değişiklik oluşması ve ilacın hücre içine geçişinin azaltılması şeklindedir. Kinolon direnci, ilacın hedefindeki değişimlerden, ilacın hedefine etkin konsantrasyonlarda ulaşamamasından bazen de her iki mekanizmanın birlikte görülmesinden kaynaklanabilir (55,57). Kinolonların klinikte kullanım oranıyla doğru orantılı olarak direnç gelişimi artışı gözlenmekte ve kinolonlar arası çapraz direnç görülmektedir.

1. Hedef enzimlerdeki değişimler

Hedef enzimlerde ki değişimler, enzim alt ünitesini kodlayan genlerdeki spontan mutasyonlardan kaynaklanır. Klasik olarak gram negatif bakterilerde ilk basamak direnç gelişimi DNA giraz geninde ortaya çıkan mutasyonlarla meydana gelir ve kinolonun MİK (Minimal inhibitör konsantrasyon) değerinde 4-8 kat artış görülür. Dirençli bakterilerin gyrA alt üniteleri ele alındığında aminoasit değişimlerinin genellikle amino ucundaki enzim aktif bölgesinde bulunan tirozin molekülünün (Tyr-122) çevresinde yer aldığı görülmektedir. Bu tirozin molekülü topoizomerizasyon sırasında kesilmiş DNA uçlarına kovalan olarak bağlanmaktadır. Kristallografik analizler de dirence yol açan aminoasit değişimlerinin kinolonların bağlandığı kısmı oluşturan üç boyutlu bir bölgede toplandığını göstermektedir. Bu bölgeye kinolon direncini belirleyen bölge (Quinolone Resistance Determining Region QRDR) adı verilmektedir (54). *Pseudomonas aeruginosa*'da en sık gyrA geninde oluşan mutasyon görülmektedir. Bu mutasyon 83. kodonda bulunan Treonin aminoasitinin (ACC) izolösin (ATC) aminoasidine değişimi şeklindedir (Tablo 4). Sadece gyrB genindeki mutasyonlara bağlı direnç ise düşük düzeydedir. GyrB geninde oluşan mutasyonlara bağlı gelişen direnç tüm kinolonlara karşı olmayabilir. Topoizomeraz IV genindeki mutasyonlar ise DNA giraz geninde mutasyon olmadığı durumlarda sessiz kalırlar ve MİK artışına yol açmazlar. Gram pozitif bakterilerde ise ilk

mutasyon topoizomerez IV genindedir. Eğer DNA giraz ya da topoizomerez IV genlerinin birinde mutasyon ortaya çıkarsa diğer gendeki mutasyonun ortaya çıkma olasılığı artar ve yüksek düzeyde direnç gelişir. Böylelikle yeni kuşak kinolonlara da dirence neden olur (54,55,56).

Tablo 3. *P.aeruginosa*'da kinolon direncini belirleyen bölgede GyrA geninde meydana gelen aminoasit değişimleri

Tr	Altünite	Aminoasit no	Kinolon mutasyonu
<i>P.aeruginosa</i>	GyrA	87	Asp → Asn
<i>P.aeruginosa</i>	GyrA	87	Asp → Tyr
<i>P.aeruginosa</i>	GyrA	83	Thr → Ile

*Asp-Aspartik asit, Asn-Asparagin, Tyr-Tirozin, Thr-Treonin, Ile-İzolösin

2. İlaç geçirgenliğindeki değişimler

Son yıllarda florokinolonların hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşmasını engelleyen temel mekanizmanın aktif pompa sistemleri olduğu belirlenmiştir. Aktif pompa sistemleri her tür hücrede bulunmakta ve antibiyotiklerden hücreyi korumaktadır. Kinolonların gram negatif bakterilerde hedeflerine ulaşabilmeleri için dış membranı ve sitoplazmik

membranı geçmeleri gerekir. Florokinolonlar moleküler yapılarının küçük olması ve porinler ile sitoplazmik membrandan geçmelerine engel olmayacak iyonik özellikleri nedeniyle hücre içerisine kolaylıkla girerler. Ancak Omp F gibi bazı porin proteinlerinin kaybı veya değişimi nedeniyle ilacın, sitoplazma içerisinde konsantrasyonunu düşürerek dirence neden olabilmektedir.

Aktif pompa sistemleri, kullandıkları enerji kaynağı, transport yolu, filogenetik özellikleri, yapısal özellikleri ve substrat profillerine göre birincil ve ikincil aktif transport sistemleri olarak iki ana gruba ayrılırlar. Birincil aktif transport sistemleri arasında, ATP bağlayan kaset (ATP-binding cassette-ABC) üst ailesine bağlı olan altı aile antibiyotik atılımından sorumludur. Bunlar özellikle ökaryotik hücrelerden antibiyotik atılımında rol oynamaktadır. İkincil aktif transport sistemleri (antiport, simport ve uniportlar) ise beş üst aile [SMR (Small Multidrug Resistance), MET (Multidrug Endosomal Transporter), MAR (Multi Antimicrobial Resistance), RND (Resistance Nodulation Division) ve MFS (Major Facilitator Superfamily)] içerisindeki on aileden oluşmaktadır. SMR ve RND üst aileleri sadece prokaryot hücrelerde bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerin antibiyotik direnci açısından en önemli grup RND üst ailesidir. Bu yapısal organizasyon substratların dışarıdan alındığı gibi tekrar dışarı atılmasını sağlamaktadır. *P.aeruginosa*'nın Mex AB-OprM pompaları bu sisteme örnek verilebilir. Kinolon direncinin görülebilmesi için pompa

sistemlerinin aşırı üretilmesi gereklidir. Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direnç gelişimine neden olur. Bu da pompa proteinlerinin ekspresyonunu arttıran ve genellikle kontrol genlerini ilgilendiren kromozomal bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Pompa sistemlerinin indüklenmesi ile sadece florokinolonlara değil, pompanın substratları olan beta laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklinler, trimetoprim gibi farklı antibiyotiklere karşı da çoğul direnç görülmektedir(49,55,56). Buna mar (multiple antibiotic resistance) fenotipi adı verilir. Gram negatif bakterilerin kinolon pompa sistemleri RND, gram pozitif bakterilerin ise genellikle MFS üst ailesinde yer almaktadır (60). Pompa sistemleri, giraz geninde tek nokta mutasyonu taşıyan suşlarda direnç açısından sinerji göstererek MİK düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır.

Tablo 4. *P. aeruginosa*'nın kinolon direncinde rol alan pompa sistemleri

Tür	Pompa ailesi	Pompa proteini	Füzyon proteini	Dış membran proteini	Düzenleyici gen
<i>P.aeruginosa</i>	RND	Mex B	Mex A	Opr M	<i>mex R</i>
		Mex D	Mex C	Opr J	<i>nfx B</i>
		Mex F	Mex E	Opr N	<i>nfx C ve met T</i>
		Mex Y	Mex X	Opr M	<i>mex Z</i>

Antimikrobiyal Direncin Saptanması

Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan in vitro işlemlere genel olarak duyarlılık testleri adı verilmektedir. Duyarlılık testinin amacı, hastanın tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyalın in vitro şartlarda etkinliğini tahmin etmektir. Antimikrobiyal ajanın etken mikroorganizma üzerine in vitro aktivitesi tedavi seçiminde göz önüne alınması gereken faktörlerden birisidir.

Bakteriler için antimikrobiyal duyarlılık testleri ya görülebilir üremeyi önleyen en düşük antimikrobiyal miktarının saptanmasıyla kantitatif olarak, antimikrobiyal içeren diskler kullanılarak duyarlı, orta duyarlı, dirençli gibi değerlerin verilmesiyle kalitatif olarak ya da moleküler olarak saptanmaktadır. Bir antimikrobiyalın etkinliğinin ölçülmesi amacıyla görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik ilaç yoğunluğu saptanır. Buna minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) denir ve mg/L şeklinde ifade edilir. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ise mikroorganizmayı öldüren en düşük konsantrasyon olarak ifade edilir.

1. Konvansiyonel Yöntemler

Konvansiyonel yöntemlerle antimikrobiyal duyarlılık tespit edileceğinde ilk önce mikroorganizmaların kültür yöntemiyle üretilmesi

gerekmektedir. Daha sonra mikroorganizmalar değişik konsantrasyonlarda etkili madde içeren antimikrobiyal maddelerle uygun koşullarda test edilir.

1.1 Sulandırım Yöntemleri

Sulandırım yöntemlerinde görülebilir üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik ilaç yoğunluğu (Minimum inhibisyon konsantrasyonu-MİK) saptanır. Sıvı ve agarlı besiyerinde antimikrobiyalın MİK değerleri saptanır.

1.1.1 Sıvı Besiyerinde Sulandırım

Sıvı besiyerinde duyarlılığı saptama yöntemi en duyarlı yöntemdir. Mueller Hinton buyyonu besiyeri olarak kullanılır. Antibiyotiğin seri sulandırmaları hazırlanır. Yapılan sulandırmaların her birine, son yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde bakteri ekimi yapılır. 18-24 saat inkübasyon sonrası MİK ve MBK değerleri belirlenir.

1.1.1.1 Makrodilüsyon Yöntemi

Bir dizi tüp içersine incelenen antibiyotiklerin 128 µg/ml'lik ana sulandırmaları hazırlanır. Peptonlu su veya Mueller Hinton buyyonu tüm tüplere 0,5 ml konulur. Birinci ve ikinci tüplerin her birine antibiyotiğin ana sulandırmalarından 0,5'er ml'lik aktarmalar yaparak çift kat sulandırım yapılır. Sondan bir önceki tüpten 0.5 ml dışarı atılır. Son tüp besiyeri kontrol tüpü olup bu tüpe antibiyotik konulmaz. Mikroorganizmanın ana sulandırımından tüplere 0,5'er ml dağıtılır. 35°C'de 1 gece etüvde

bekletilir. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değerini verir. MBC değerini bulmak için, tüplerde üreme olmayanlardan katı besiyerine ekim yapılır. 37°C'de inkübe edilir. Sıvı besiyerinde bulanıklık görülmediği halde bu tüplerden yapılan ekimlerde üreme görülmesi o tüplerde bakteriyostatik etkinliğin olmasına rağmen, bakterisidal etkinliğin olmadığı anlamına gelir. Antibiyotiğin katı besiyerinde üremeyen son tüpteki konsantrasyonu o antibiyotiğin MBC değerini verir.

1.1.1.2 Mikrodilüsyon Yöntemi

Makrodilüsyondan farklı olarak çok daha küçük miktarlar kullanılarak yarı otomatik ya da tam otomatik sistemlerle daha çabuk ve ekonomik sonuç alınır. Tek kullanımlık çok sayıda kuyucuk içeren mikrodilüsyon pleytleri kullanılarak MİK ve MBC değerleri belirlenir.

1.1.2 Agar Dilüsyon Yöntemi

Agar dilüsyon besiyeri için Müller Hinton besiyeri kullanılır. Her bir suş için %0,09'luk NaCl içerisinde 0,5 Mc Farland standardına eşdeğer koloni süspansiyonu hazırlanır ve multi point inoculator aracılığıyla antibiyotik seri dilüsyonlarını içeren plaklara ekim yapılır. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra NCBI önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini yapılmak üzere değerlendirilir. Agar dilüsyon yönteminin avantajı bir plakta birden fazla bakterinin denenmesini sağlar ancak MBC değeri saptanamamaktadır.

1.2 Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi ya da yayılım yönteminde Müller Hinton besiyeri ve Diagnostic Sensitivity Test (DST) Agar kullanılır. Petrilere 0,5 Mc Farland standardına eşdeğer koloni süspansiyonu steril eküvyonla homojen olarak yayılır. Belli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş küçük diskler besiyerine yerleştirilir. Plaklar 35°C'de 18-24 saat etüvde inkübe edilir. Diskteki antibiyotikler agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon zonu oluşur. Oluşan inhibisyon zon çapları cetvelle ölçülerek daha önce belirlenmiş çizelgedeki değerlerle karşılaştırılır. Her antibiyotik için dirençli, az duyarlı ve duyarlı olarak değerlendirilir.

1.3 E Testi

Mikroorganizmaların antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını kantitatif olarak ölçen ve disk difüzyon temeline dayanan ancak disk yerine belirli ve her noktasında farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plastik şeritler kullanılarak MİK değerini belirleyen bir yöntemdir. Giderek azalan konsantrasyonda antibiyotik emdirilmiş plastik şeritlerin 150 mm.'lik Müller Hinton agar plağa tek tek veya radyal olarak dizilmesi temeline dayanır. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra şeritlerdeki antibiyotik gradyenti, eliptik inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olur ve bu eliptik zonun şeritle kesiştiği antibiyotik konsantrasyonu, MİK değerini verir. Bu değerlerin

hazır cetvelle karşılaştırılması ile bakterinin o antibiyotiğe duyarlı veya dirençli olduğu belirlenir.

1.4 Otomatik ve Hızlı Direnç Saptama Yöntemi

Mikroorganizmaların otomatik aletlerle hızlı identifikasyonları ve antibiyotiklere karşı direncini ölçme temeline dayanır. Mikroorganizmaların uygun konsantrasyonlarda süspansiyonları, belirli miktarlarda antibiyotik bulunduran mikropaklara ekimi yapılır. Otomatik cihazların yöntemine ve incelenen mikroorganizmanın özelliğine göre sonuçlar 4-24 saat sonra MİK değerleri ile birlikte değerlendirilerek verilir.

2. Moleküler Yöntemler

Antibiyotik direncinin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin bir çoğu üç basamaktan oluşmaktadır.

a) DNA eldesi

Mekanik parçalama ve kaynatma gibi basit teknikler genomik DNA'nın eldesi için yeterli olmaktadır.

b) Hedef DNA'nın amplifikasyonu

Bu amaçla çoğu kez Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılmaktadır.

c) Mutasyonların Saptanması

Uygun primerlerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar çeşitli yöntemlerle saptanmaktadır.

2.1 Tek İplikçik Konformasyon Polimorfizmi Analizi

1989 yılında Orita ve arkadaşları tarafından geliştirilen tek iplikçik konformasyon polimorfizmi analizi (Single strand conformation polymorphism, SSCP) bilinmeyen mutasyonların taranmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Çift iplikli PZR ürünleri formamid gibi denatüran maddeler ile ısıtılarak denatüre edilir ve poliakrilamid jellerde elektroforetik olarak ayrılır. Gümüş veya floresan boyalarla boyanarak görüntüleme yapılır. SSCP, özel donanım ihtiyacı duyulmaması nedeniyle uygulanması kolay ancak duyarlılığı düşük bir yöntemdir. SSCP ile 200 bp'ye kadar olan fragmanlarda nokta mutasyonlarının yaklaşık % 80'i belirlenebilirken, fragmanların büyüklüğü arttıkça duyarlılık azalmaktadır (65).

2.2 Heterodupleks Analiz

Heterodupleks analiz (HDA) jel temelli bir mutasyon tarama yöntemidir. Kullanım kolaylığı nedeniyle, tek baz değişikliklerinin, küçük delesyon ve insersiyonların taranmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Yöntem tek baz veya yarı uyumsuzlukları nedeniyle DNA duplekslerinin elektroforetik hareketindeki farklılıkları belirlemeye dayanır. Elektroforezden önce, farklı kaynaklardan çoğaltılan, mutasyon taşımayan ve taşıyan PZR ürünlerinin yüksek sıcaklıkta denatüre edilmesi ve tekrar yapıştırılması ile dupleksler oluşturulur. Sonuçta iki heterodupleks ve iki homodupleks içeren bir karışım elde edilir. Elektroforetik ayırma poliakrilamid jellerde doğal şartlarda gerçekleştirilir. Geleneksel HDA'nın mutasyon belirleme oranı % 80 civarındadır (65).

2.3 Denatüre Edici Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografi (Denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 1.5 kb'a kadar olan DNA fragmanlarındaki tek nükleotid değişiklikleri, küçük insersiyon ve delesyonları yüksek duyarlılıkta (> % 95) belirlemektedir. Yöntemin temeli, PZR ürünlerinin denatürasyonu ve yeniden yapıştırılması ile oluşturulan dupleksler, önceden ısıtılmış HPLC kolonuna yüklenir ve organik çözücünün artan konsantrasyonu ile oluşturulan gradyan sayesinde trietilamonyum asetat varlığında çözündürülür ve negatif yüklü DNA ile pozitif yüklü trietilamonyum iyonları arasındaki elektrostatik sayesinde birikme sağlanır. Heterodupleksler kolondan daha önce ayrılır ve ultraviyole veya floresan dedektörlerle belirlenir (65).

2.4 Denatüre Edici ve Sıcaklık Gradyenti Jel Elektroforezi

Denatürasyon esnasında homodupleks ve heteroduplekslerin farklı ayrılmalarına dayanarak denatüre edici gradyent jel elektroforezi (Denaturing gradient gel electrophoresis,DGGE) ve onun bir varyantı olan sıcaklık gradyenti jel elektroforezi (Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) geliştirilmiştir. Her iki yönteminde yüksek duyarlılığa sahip, mutasyon belirleme oranları %100' e yakındır. Çift iplikli DNA farklı gradyentlerde denatüran veya lineer sıcaklık gradyenti içeren vertikal poliakrilamid jellerde ayrılır. Ayrılma esnasında en düşük erime sıcaklığına sahip olan DNA kümesi ilk önce denatüre olur ve dallanma ve ayrılma ortaya çıkar. Jellerin etidyum bromid, gümüş veya floresan boya ile boyanması ile hareket farklılıkları görüntülenir (65).

2.5 PZR ve Kesilmiş Fragmanların Uzunluk Polimorfizmi

Restriksiyon endonükleazlar (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. RE ile PZR ürünlerinin kesilmesi, agaroz jel elektroforezi ile ayrılabilen birkaç fragman oluşmakta ve elde edilen ürünlerin büyüklüğüne göre belli profiller ortaya çıkmaktadır. Mutasyonlar kesim bölgesini değiştiriyorsa, endonükleaz bu bölgeyi tanımayabilir ve DNA'yı kesmeyebilir. Sonuçta farklı büyüklüklerde fragmanlar ortaya çıkar ve kesilmiş fragmanların uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) profilinde değişiklikler oluşur. RFLP yöntemi kolay

uygulanan duyarlı bir yöntemdir ancak çok sayıda ya da yakın bantların değerlendirmesinde zorluklar yaşanabilmektedir (65,66).

2.6 Allel Özgöl PZR

Allel veya mutasyon özgöl PZR primerleri, primerlerin hedef bölgeleri arasındaki farklılıklara göre birbirinden ayrılır. Sadece primer bölgelerine tam olarak karşılık gelen diziler çoğaltılır. Bu yöntemde primerlerin doğru şekilde tasarlanması ve reaksiyon şartlarının optimizasyonu gerekmektedir.

2.7 Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı (Real Time) demek, reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizinin aynı anda devam etmesi demektir. İn vitro nükleik asit çoğalmasının, amplifikasyon programındaki döngülerin artışına paralel olarak artan amplikonların tespit edilmesiyle belirlenmesi esasına dayanır. Gerçek zamanlı PZR'da amplifikasyon ve analiz birlikte yapılır. Bu yöntemde PZR sırasında oluşan ürünler özgöl probalar veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyalar (Sybergreen, etidyum bromür) yardımıyla saptanmaktadır. Gerçek zamanlı PZR'da oluşan amplikonların erime ısısı (T_m) değerleri belirlenerek özgöl mutasyonlar saptanabilmektedir.

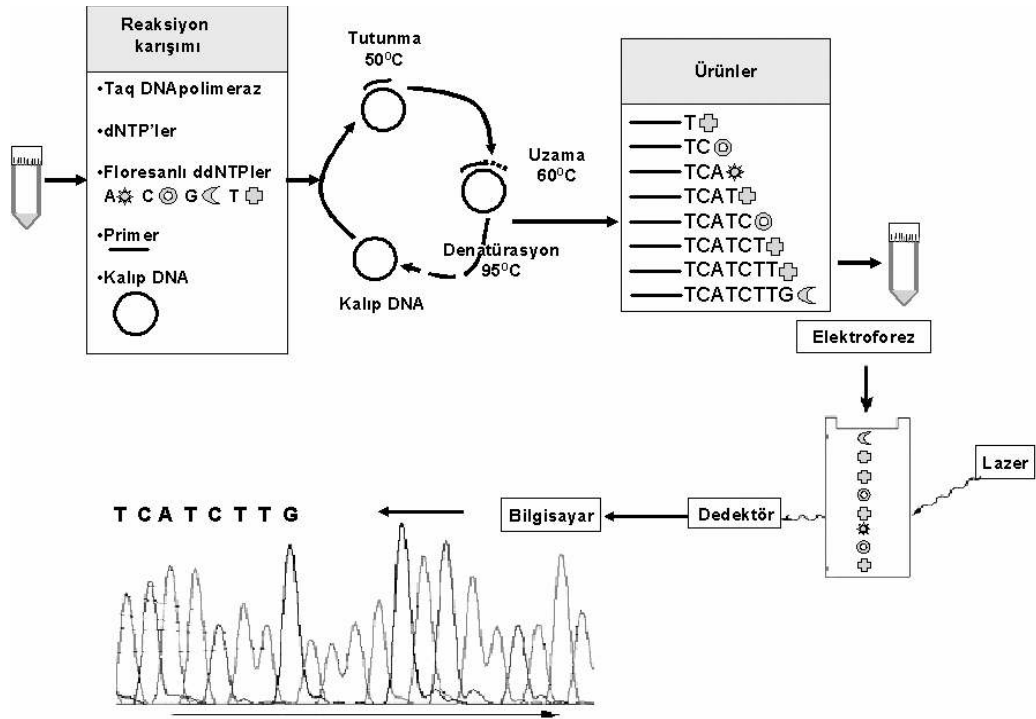
2.8 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir. Önceden bilinen ve bilinmeyen mutasyonlar saptanmaktadır. DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma tekniğine dayanan dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. DNA dizi analizinde dört ana basamak vardır. Bu basamaklar DNA amplifikasyonunu da içine alan nükleik asit izolasyonu, DNA sentezi ve nükleik asit hedefinin işaretlenmesi, işaretlenmiş hedeflerin elektroforetik olarak ayrılması ve elektroforezden elde edilen bilginin anlamlı DNA dizisine dönüştürülmesidir (64,65).

Zincir sonlandırma yöntemine dayanan otomotize DNA dizi analizinde PZR ile çoğaltılan hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunacak bir primer kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi bu karışıma eklendiğinde primerin tutunduğu kalıp deoksinükleotidtrifosfat (dNTP) varlığında sentez reaksiyonunu başlatır. Reaksiyon tüpünde her biri farklı floresan boyalarla işaretlenmiş 2'-3' dideoxinükleotidtrifosfatlar da (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) bulunmaktadır. Yapısal olarak dNTP'lere benzeyen ddNTP'lerin 3' hidroksil grupları bulunmamaktadır. Dideoksinükleotidtrifosfatlar, DNA polimeraz etkisiyle uzayan DNA zincirine katılır fakat 3' hidroksil grubu bulunmadığından kendilerinden sonra 5'-3' fosfat bağlanmasını engelleyerek zinciri sonlandırırlar. Spesifik olarak sonlandırılan DNA dizileri kapiller elektroforez ile yürütülür. Bu işlem sırasında sonlanan her

bir dizide bulunan ddNTP'lerin yaydığı farklı dalga boyundaki floresanslar DNA dizi analizi cihazında bulunan lazer tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamına aktarılır. DNA dizisinin değerlendirilmesi, raporlandırılması ve derlenmesi için çok sayıda program veya veri tabanı kullanılmaktadır.

Şekil 1. Otomotize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları



2.9 DNA Microarray

Son yıllarda küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu DNA Microarray ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan *gen chip* teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem, PZR ile elde edilen floresanla işaretli amplikonların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Gen çipleri, yüzeyler üzerine yüksek yoğunlukta yerleştirilmiş çok sayıda probun oluşturduğu dizilerden oluşur ve sinyallerin belirlenmesi için konfokal mikroskopiye ihtiyaç duyulur. PZR ürünleri yerleştirilen bütün problara aynı anda hibridize edilir ve reaktif floresan tespiti ile ölçülebilir. Avantajı, tek bir hibridizasyon reaksiyonunda çok sayıda prob değerlendirilebilir (64,65)

Direnç Epidemiyolojisi

Hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında artan antimikrobiyal direnç oranları son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Özellikle başlangıç MİK (minimal inhibisyon konsantrasyonu) yüksek olan *P.aeruginosa* suşlarında önemli sorun olmaktadır. Ülkemizde ve yurtdışındaki kliniklerde yapılan çalışmalarda, *P.aeruginosa* suşları en sık yoğun bakım ünitesinden izole edilmekte olup yüksek oranda antimikrobiyal direnç ve çoğul direnç

özellikleri göstermektedir. Bu direnç mekanizmalarının bilinmesi ve yayılımının önlenmesi önemlidir.

2 MATERYAL VE METOD

Besiyerleri, Kimyasal Bileşikler

Eozin Metilen Blue (Fluka, İspanya)

Müller Hinton Agar (Fluka, İspanya)

Tarivid (Aventis, Fransa)

HCl (J. T. Baker, Hollanda)

Tris base (Amiesco, ABD)

Borik asit (Scharlau,İspanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Carlo Erba)

MgCl₂ (Bioron, Almanya)

dNTP (Bioron,Almanya)

Primerler

Buffer (Bioron,Almanya)

Taq Polimeraz (Bioron,Almanya)

Agaroz (Sigma,ABD)

Etidyum Bromid

Yükleme Tamponu

Invisorb Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments (Invitek,Almanya)

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems,ABD)

Izopropanol (Sigma,ABD)

Formamid (Applied Biosystems,ABD)

Cihazlar

Hassas Terazı (Schimadzu, Japonya)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Etüv (Nüve, Türkiye)

Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)

Vorteks (MS2 Minishaker,IKA)

Mikropipetler (eppendorf Research, Almanya)

Isı döngü aleti (GeneAmp PZR System 9700,Applied Biosystems,ABD)

ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,ABD)

Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich,Almanya)

Yatay elektroforez

Jel Görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius,ABD)

-80 derin dondurucu (Nuaire, Japonya)

2.1 Örnekler

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli materyallerden üreyen toplam 93 nonfermentatif bakteriye tür düzeyinde konvansiyonel yöntemlerle isimleri konuldu. *P. aeruginosa* olarak tiplendirilen bakteriler çalışmaya kadar -80°C'de saklandı.

Tablo 5. Nonfermentatif bakterilerin izole edildiği klinik örnekler

Örnekler	Adedi
yara yeri	14
idrar	25
bronkoalveolar lavaj	13
balgam	15
boğaz kültürü	2
katater	5
periton sıvısı	1
BOS	2
kan	8
Trakeal aspirat	4
parasentez	1
trakeostami	2
dekübit	1

2.2 Bakterinin Konvansiyonel Yöntemlerle Tiplendirilmesi

Mikrobiyoloji Laboratuvarından toplanan nonfermentatif bakterileri tiplendirmek için karbonhidrat oksidasyon fermentasyon testleri, oksidaz testi, üre agar besiyeri, lizin dekarboksilaz, üç şekerli demirli besiyeri, hareket testi, jelatin hidrolizi testi, sitrat besiyeri ve nitrat indirgeme testleri yapıldı.

2.2.1 FENOTİPİK YÖNTEMLER

2.2.1.1 Karbonhidrat Oksidasyon Fermentasyon Testi

Tablo 6'de belirtilen karbonhidrat stok çözeltisi dışındaki maddeler karıştırılarak eritilir. pH 7.1'e ayarlanır ve karışım 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 55°C'ye soğutulduktan sonra %1 (ağırlık/hacim) konsantrasyonundaki karbonhidrat çözeltisi, 0,22 µm por çaplı filtreden besiyeri içerisine süzülür.

Tablo 6: Karbonhidrat oksidasyon fermentasyon testleri için kullanılan besiyeri bileşimi

Malzeme	Miktar
Pepton	0.4g
NaCl	1 g
K ₂ HPO ₄	0.06 g
Brom Timol Mavisi	0.015 g
Agar	0,6 g
Karbonhidrat Stok Çözeltisi	20 ml
Distile Su	180 ml

Nonfermentatif bakterilerin tiplendirilmesi için kullanılan karbonhidratlar ise %1 glukoz, %1 maltoz, %1 mannitol ve %10 laktoz'dur ve çalışmada bu karbonhidratları içeren besiyerleri kullanıldı. İzole edilen her bakteri için iki besiyerine ekim yapılır. Besiyerlerinden birine steril mineral yağ konularak hava ile teması kesilir. Ekilen besiyerleri, 35°C'de 4 gün inkübe edilir. İnkübasyon süresi boyunca mineral yağ ile kaplı olmayan kontrol tüpte indikatörün yeşilden sarıya dönmesi pozitif sonuç olarak kabul edilir.

2.2.1.2 Oksidaz Testi

Tetrametil parafenilen diamin hidrokloridin saf sudaki %0,5-1'lik eriyiği hazırlanır. Besiyerindeki kolonilerden steril kürdan

yardımıyla ayıraçla ıslatılmış süzgeç kağıdının üzerine bir miktar sürülür. 5-10 saniye içinde kolonilerin mor renge dönüşmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

2.2.1.3 Üre Besiyeri

2,4 gr Üre agar (OXOID) 95 ml distile su içerisinde çözülür ve pH 6,8'e ayarlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50-55°C'ye soğutulduktan sonra 5 ml distile su içerisinde çözülen 2 gr üre, filtreden süzülerek besiyerine ilave edilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyonun sonunda kırmızı renk oluşması pozitif sonuç, hiç renk değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirilir.

2.2.1.4 Lizin Dekarboksilaz Testi

Tablo7'de belirtilen maddeler distile su içerisinde çözülür ve pH 4,6'ya ayarlandıktan sonra cam tüplere dağıtılır. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Ekimi yapılan besiyerleri 35°C'de 18-24 saat inkübe edilir ve besiyerinin bulanıklığı pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Tablo 7: Lizin dekarboksilaz testi için kullanılan besiyeri bileşimi

Malzeme	Miktar
L-Lizin	0,5 g
Dekstroz	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Distile su	1000 ml

2.2.1.5 Üç Şekerli Demirli Besiyeri

Toz halindeki Triple Sugar Iron Agar (HI MEDIA) 65 gr tartılır ve 1000 ml distile su içerisinde çözülür. pH 7,4'e ayarlanır. 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril cam tüplere dağıtılır, yatık olarak katılaştırılır. Ekimi yapılan besiyerleri 35°C de 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda besiyerinin yatık ve dip kısımlarında asit ve H₂S üretimi değerlendirilir.

2.2.1.6 Hareket besiyeri

Tablo 8'de belirtilen maddelerle hazırlanan besiyeri pH 7.0'ye ayarlanır ve cam tüplere dağıtımı yapıp 121°C'de 15 dakika steril edilir. Ekimi yapılan besiyerleri 35°C inkübe edilip besiyerinde hareketli bakterilerin inokülasyon çizgisinden yanlara doğru dağılarak bulanıklık oluşturmaları pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Tablo 8. Hareket besiyeri için kullanılan besiyeri bileşimi

Malzeme	Miktar
Sığır Eti Özütü	3 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	4 g
Distile Su	1000 ml

2.2.1.7 Jelatin hidrolizi testi

Tüm malzemeler sıcak suda eritilip, pH 7'ye ayarlanır. 121°C'de 15 dakika steril edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri düz şekilde dondurulur ve ekimi yapılan besiyerleri 18-24 saat 35°C'de inkübe edildikten sonra 15-20 dk +4°C'de bekletilir ve katı jelatinin erimesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Tablo 9. Jelatin hidrolizi testi için kullanılan besiyeri bileşimi

Malzeme	Miktar
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Jelatin	120 g
Distile su	1000 ml

2.2.1.8 Sitrat Besiyeri

24,2 gr toz haldeki Simmons Citrat Agar (HI MEDIA) 1000 ml distile su içerisinde çözülür. pH 6,8'e ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika steril edilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyonun sonunda besiyerinin renginin koyu mavi olması sitrat pozitif olarak değerlendirilir.

2.2.1.9 Nitrat İndirgeme Testi

A- Nitrat buyyon

Sığır eti özütü	3 g
Pepton	5 g
Potasyum nitrat (KNO ₃)	1 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile su içerisinde çözülür ve pH 7'ye ayarlandıktan sonra cam tüplere dağıtılıp 121°C'de 15 dakika steril edilir.

B- Ayıraç A

α-naftil amin	5 g
Asetik asit (%30, 5N)	1000 ml

C- Ayıraç B

Sulfanilik asit	8 g
Asetik asit (%30, 5N)	1000 ml

Ekimleri yapılan besiyerleri 35°C'de 18-24 saat inkübasyonun sonunda önce 1ml A sonra 1ml B ayıracından besiyerine konulur. 30 saniye sonra kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç verir. Hiç renk oluşmaması nitratın indirgenmediğini (negatif sonuç) veya diğer nitritlere indirgendiğini gösterir. Bu durumda az bir miktar çinko eklenir. Çinko iyonları nitratları nitrite indirger ve çinko eklenmesinden sonra kırmızı renk oluşur. Bu reaksiyon sonucunda doğru pozitif sonuç verilebilir.

2.1.10 AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

Agar dilüsyon besiyerinin hazırlanması

Agar dilüsyon için Müller Hinton besiyeri kullanılır. Toz haldeki Müller Hinton agar (FLUKA) besiyeri, petri sayısı hesaplanarak tartılır ve her petriye 19 ml dökülecek şekilde hesabı yapılarak distile su ile çözülür. 121°C'de 15 dakika steril edilir ve petri kabına önce 1 ml antibiyotik solüsyonu sonra 19 ml besiyeri koyulur.

Her bir suşun %0,09'luk NaCl içerisinde 0,5 Mc Farland standardına eşdeğer koloni süspansiyonu hazırlanır ve çoklu dağıtım aleti aracılığıyla seri dilüsyon halinde ofloksasin içeren plaklara ekim yapılır. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra NCBI önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini yapılmak üzere

değerlendirilir. MİK değeri, üremenin olmadığı ilk konsantrasyon olarak belirlenir. Ofloksasin için duyarlılık, orta duyarlılık ve dirençlilik sınırları sırasıyla; ≤ 2 mg/L, 4 mg/L ve ≥ 8 mg/L kabul edildi. Kontrol suş olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

2.2 MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Pseudomonaslarda kinolon direncine neden olan *gyrA* bölge mutasyonunun tanımlanması DNA dizi analizi ile çalışıldı. Bunun için kültürden elde edilen bakterilerin kaynatma yöntemiyle DNA'ları elde edildi. *gyrA* gen bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması, PZR ürünlerinin görüntülenmesi, saflaştırma işlemi, döngüsel dizi analizi tepkimesi ve presipitasyon işlemlerinden sonra kapiller elektroforezi yapılarak diziler kromotogram dosyaları şeklinde kaydedildi.

2.2.1 DNA'nın elde edilmesi

Kültürden alınan bakterilere kaynatma yöntemi uygulanarak DNA'nın ekstraksiyonu yapıldı.

1. 1000 µl Tris-Edta pH 8.0 (TE) içine öze dolusu koloniler toplanır.
2. 5 dakika 6500 rpm'de santrifüj yapılır. Üstteki sıvı dökülür.

3. Bu yıkama işlemi 3-4 kez tekrar edilir.
4. En son kalan pelletin üzerine 200 µl TE koyulur ve vortekslenir.
5. 20 dk 95°C'de bekletililerek bakterilerin parçalanıp DNA'nın açığa çıkması sağlanır.
6. Santrifüj edilip üst sıvı alınarak yeni ependorfa aktarılır.

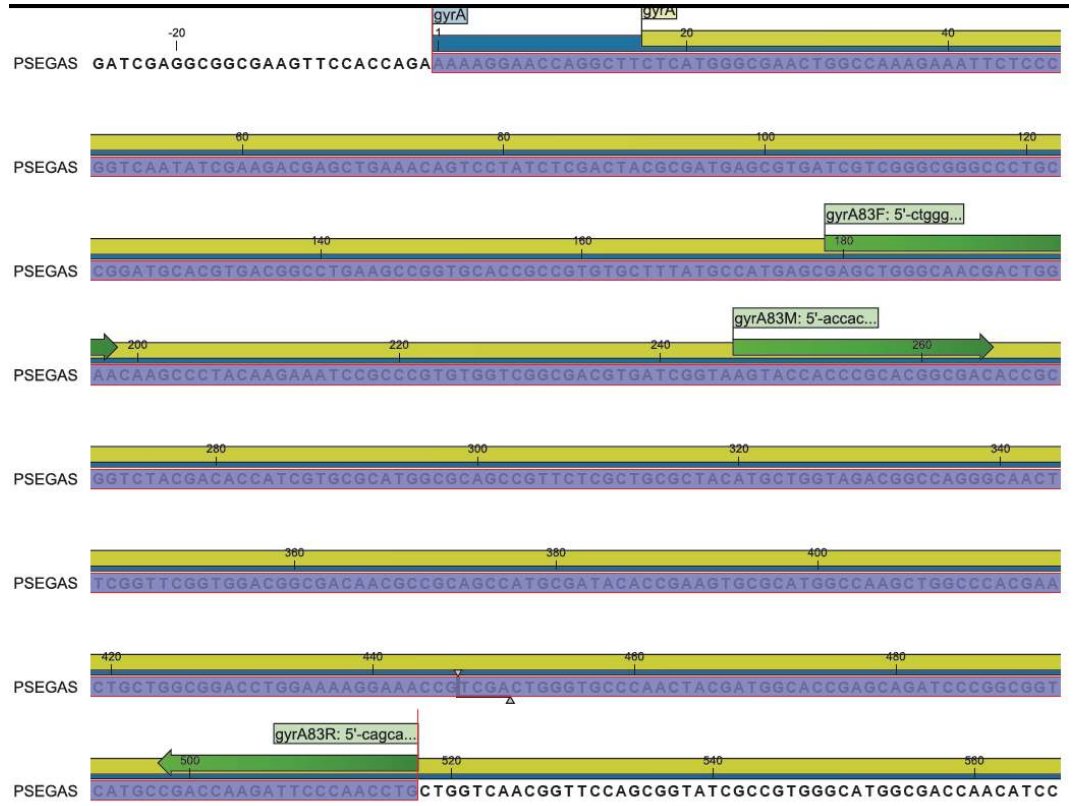
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile hedef bölgenin çoğaltılması

Tablo 10. Amplifikasyon ve dizi analizi için kullanılan primerler

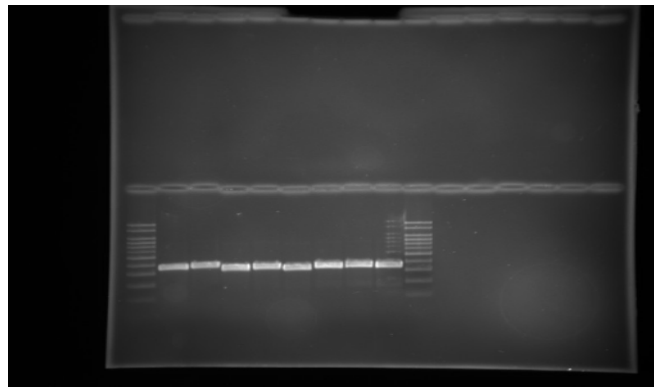
Primer	Nükleotid sekansı
GyrA 83 F	5'-CTGGGCAACGACTGGAACAA-3'
GyrA 83 R	5'-CAGCAGGTTGGGAATCTTGG-3'

* F, forward primer; R, reverse primer

GyrA Forward (F) ve GyrA Reverse (R) primerleri ile *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin gyrA gen bölgesinin 339 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması hedeflenmiştir. GyrA PZR için öncelikle optimum MgCl₂ kalibrasyonu yapıldı ve primer konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 2. *Pseudomonas aeruginosa* suşunun *gyrA* forward (F) ve reverse (R) primer çiftinin *gyrA* üzerindeki yerleşimi



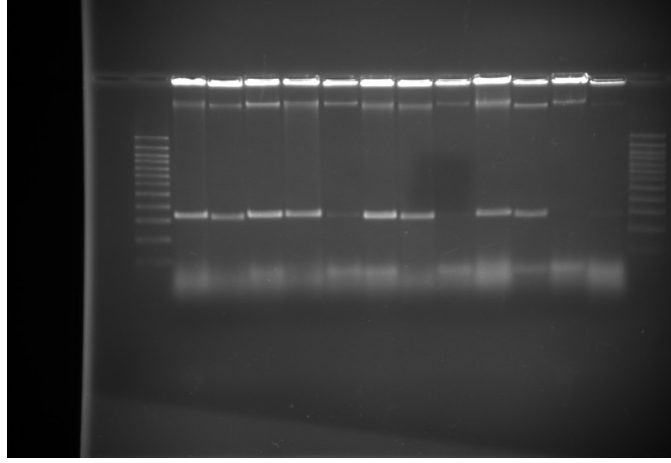
Resim 1. $MgCl_2$ kalibrasyonu ve DNA moleküler ağırlık standardının görüntülenmesi

PZR karışımı içinde, 1X Buffer (MgCl₂'süz), 4,5 mM MgCl₂ , 0,2 mM dNTP, 0,6 µM GyrA 83 F ve GyrA 83 R primerleri ile 0,025 U/µl Taq polimeraz içerir. Toplam karışım 32 µl olacak şekilde ependorflara dağıtım yapılır ve her bir örneğe 3 µl DNA eklenir. Tamamlanan ana karışım daha sonra şu şartlarda sıcaklık döngüsüne tabi tutulur.

Sıcaklık döngüleri:

Denatürasyon	94°C'de	1 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94°C'de	15 saniye	40 döngü
Bağlanma	60°C'de	45 saniye	
Uzama	72°C'de	1 dakika	
	72°C'de	10 dakika	1 döngü

Isı döngü cihazında çoğaltılmış olan PZR ürünlerini görmek için % 2'lik agaroz jele 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak yüklenir. İlk kuyucuğa standart molekül ağırlığı yüklenir. Elektroforezde yürütüldükten sonra etidyum bromür boyası ile boyanır ve UV ışığı altında görüntülenir. 339 bç'lik amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi reaksiyonunun kabul edilebilir olduğunu gösterir. Görüntülenen örnekler saflaştırma işlemi uygulanır.



Resim 2. *P. aeruginosa* suşlarının gyrA gen bölgesinin PZR ürünlerinin ve DNA moleküler ağırlık standardının görüntülenmesi

2.2.3 PZR ürünlerinin temizlenmesi

Amplifikasyon ürününü DNA dizi analizine hazırlamak için PZR ürünlerinden temizlenmesi gerekir. PZR ürünlerinin temizlenmesi için “Invisorb Spin PCRapid Kit for purification of PCR fragments” kitinin protokolüne uygun olarak saflaştırma yapıldı. Protokole göre adımlar şu şekildedir:

1. PZR reaksiyon tüpüne 130 µl BufferP karıştırılarak konulur ve spin filtreli 2.0 ml'lik tüplere aktarılır.
2. 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
3. Altta kalan filtrat atılır ve üzerine 700 µl yıkama tamponu konulur.

4. 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.

5. Filtrat atılır. Kalan etanolün uzaklaştırılması için 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

6. Spin Filtre 1.5 ml'lik tüplere alınır ve üzerine 20 µl 55°C'de ısıtılmış Elution Buffer tüplerin çevresine değıdirmeden, filtrenin üzerine koymaya dikkat ederek koyulur.

7. Oda sıcaklığında en az 5 dk bekledikten sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

PZR ürünlerinin temizlenip temizlenmediğini anlamak için agaroz jelde yürütölür.

2.2.4 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için reaksiyon karışımı 1X Tampon ve 0,16 µM gyrA primerlerinden oluşmaktadır. Tampon dNTP, ddNTP ve Taq polimeraz içerir. Toplam hacim 10 µl olacak şekilde 6 µl sekans karışımı, 4 µl DNA eklenir ve ısı döngü aletine yerleştirilir.

Isı Döngüleri;	96°C'de	10 saniye	} 25 Döngü
	50°C'de	0,5 saniye	
	60°C'de	4 dakika	

2.2.5 Sekans Ürünlerinin İzopropanol ile Presipite Edilmesi ve Formamid ile Çözülmesi

1. Reaksiyon hacimleri 20 µl'ye deiyonize su ile tamamlandıktan sonra 1.5 µl'lik ependorfa aktarılır.
2. Üzerine 80 µl %75'lik isopropanol eklenir. Kısaca vortekslenir ve 15 dakika-24 saat karanlıkta inkübasyona bırakılır.
3. 20 dakika maksimum hızda santrifüj edilir ve santrifüj biter bitmez üstteki sıvı aspire edilir.
4. Peletin üzerine 250 µl %75'lik isopropanol eklenir ve kısaca vortekslenip 5 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Üstteki sıvı aspire edilir.
5. 90°C'de 1 dk kurutulur ve 25 µl deiyonize formamid ile çözülür.

Presipitasyondan sonra örnekler sekans cihazının tüplerine aktarılır.

2.2.6 Kapiller Jel Elektroforezi

Formamitte çözünmüş örneklere 95 °C'de 2 dakika ve buz üzerinde 1 dk bekletilerek denatürasyon işlemi yapılır. Örnekler sekans cihazına yüklenene kadar buz üzerinde bekletilir.

2.2.7 Değerlendirme

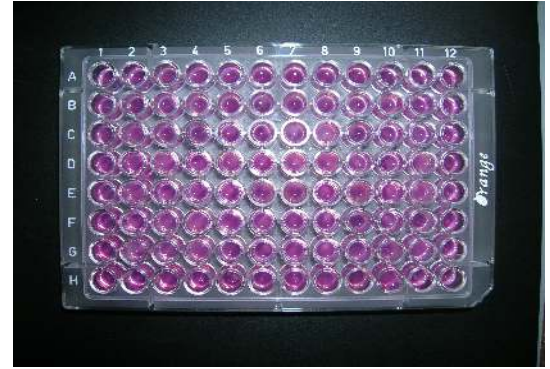
ABI Prism 310 Sekans cihazının Kapiller jel elektroforezi sırasında yapılan okumalar kromotogram dosyaları şeklinde kaydedildi. Elektroforetik görüntünün anlamlı DNA dizi verisine dönüştürülmesi için bilgisayar destekli algoritmalar, manuel işleme ve dizi derlemesine gerek duyulmaktadır (65).

3 BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 93 nonfermentatif bakteri çalışmaya alındı. İzolatlar uygulanan fenotipik testler ile tiplendirmeleri yapıldı ve tür bazında isimlendirildi. Bu testler sonucunda 93 nonfermentatif bakteriden 39 tanesi *Pseudomonas aeruginosa* olarak tespit edildi.

Tablo 11. Fenotipik testler sonucunda nonfermentatif bakterilerin tür dağılımları

Bakteri Adı	Sayısı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
<i>Acinetobacter baumannii</i>	27
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
<i>Burkholderia cepacia</i>	3
<i>Pseudomonas pickettii</i>	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1



Resim 3- Sitrat, Dekstroz, Laktoz, Maltoz, Mannitol ve Üre besiyerinde
pozitif ve negatif sonuçlar

Pseudomonas aeruginosa olarak adlandırılan bakterilere ofloksasin antibiyotik duyarlılıkları agar dilüsyon yöntemi ile bakıldı ve ofloksasin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptandı. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda üremenin olmadığı ilk konsantrasyon belirlendi. Ofloksasin için duyarlılık, orta duyarlılık ve dirençlilik sınırları sırasıyla; ≤ 2 mg/L, 4 mg/L ve ≥ 8 mg/L olarak kabul edildi.

Tablo 12. MİK($\mu\text{g/ml}$) değerleri ve duyarlılık dereceleri

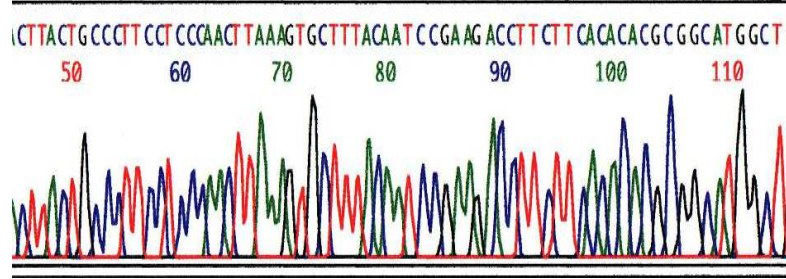
Bakteri No	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	Duyarlılık derecesi	Bakteri No	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	Duyarlılık derecesi
Pa 6	1	Duyarlı	Pa 441	2	Duyarlı
Pa 10	8	Dirençli	Pa 448	2	Duyarlı
Pa 11	16	Dirençli	Pa 472	2	Duyarlı
Pa 29	8	Dirençli	Pa 496	2	Duyarlı
Pa 31	8	Dirençli	Pa 504	2	Duyarlı
Pa 42	8	Dirençli	Pa 505	1	Duyarlı
Pa 51	8	Dirençli	Pa 506	2	Duyarlı
Pa 60	8	Dirençli	Pa 510	8	Dirençli
Pa 85	32	Dirençli	Pa 534	2	Duyarlı
Pa 207	64	Dirençli	Pa 545	2	Duyarlı
Pa 249	1	Duyarlı	Pa 550	2	Duyarlı
Pa 258	8	Dirençli	Pa 553	2	Duyarlı
Pa 260	8	Dirençli	Pa 648	4	Orta dirençli
Pa 261	4	Orta dirençli	Pa 704	8	Dirençli
Pa 312	1	Duyarlı	Pa 708	8	Dirençli
Pa 338	1	Duyarlı	Pa 715	2	Duyarlı
Pa 344	1	Duyarlı	Pa 717	1	Duyarlı
Pa 349	4	Orta dirençli	Pa 723	2	Duyarlı
Pa 422	1	Duyarlı	Pa 729	2	Duyarlı
Pa 427	2	Duyarlı	ATCC27853	2	Duyarlı

Çalışmamızda minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine göre *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin 14 tanesi (%35,89) ofloksasine dirençli, 3 tanesi (%7,69) orta düzeyde dirençli, 22 tanesi (%56,41) de duyarlı olarak tespit edildi.

Tablo 13. *P.aeruginosa* suşlarının ofloksasine duyarlılık yüzdeleri

Duyarlılık derecesi	Yüzdesi
Dirençli	% 35,89
Orta düzeyde dirençli	%7,69
Duyarlı	%56,41

Pseudomonas aeruginosa suşlarına gyrA proteininin kinolon direncini belirleyen bölgeyi kodlayan gen bölgesindeki mutasyonları DNA incelemek için dizi analizi uygulandı. Sonuçlar “NCBI” web sayfasındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırıldı ve çeşitli programlar kullanılarak değerlendirildi. Dizi analizi sonuçlarına göre 39 *P.aeruginosa* suşunda %12,82 oranında gyrA gen bölgesinin 83. kodonunda kinolon direncine sebep olan Treonin (ACC) aminoasitinin, İzolösine (ATC) aminoasidine değişimi saptandı.



Şekil 3. *Pseudomonas aeruginosa* suşunda *gyrA* gen bölgesinin kromotogram analizi

Çalışmada dizi analizi yapılan ofloksasine dirençli ve duyarlı *P.aeruginosa* suşlarının *gyrA* gen bölgesinde farklı kodonlarda Tablo 14'de gösterilen çok sayıda sessiz mutasyona rastlandı. İncelenen *gyrA* gen bölgesinde meydana gelen sessiz mutasyonlar en sık 132. kodonda meydana gelmiştir. 6 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda (%15,38) herhangi bir mutasyona rastlanmadı.

4 TARTIŞMA ve SONUÇ

Pseudomonas cinsi bakteriler toprakta ve suda yaşayan gram negatif, nonfermentatif, aerob bakterilerdir. *Pseudomonas* cinsi içerisinde en sık izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P.aeruginosa* daha çok hastane enfeksiyonlarında, immün yetmezliği olanlarda, malign veya metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde en önemli enfeksiyon etkenlerinden birisidir. Özellikle yoğun bakım ünitesi ve nötropenik hastaların izlendiği bölümlerde bu bakterinin etken olduğu hastane enfeksiyonları ön plana çıkmaktadır (67).

Değişik çalışmalarda, hastane enfeksiyonlarının %8-25'inden *P.aeruginosa*'nın sorumlu olduğu gösterilmiştir. Çoklu ilaç direncine sahip *P.aeruginosa* suşları ile gelişen enfeksiyonların tedavisi, antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olması klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardandır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* suşları en sık yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiş olup, sıklık sırasına göre izole edildikleri klinik materyaller trakeal aspirat, idrar ve yara yeri kültürüdür (83).

Yaptığımız çalışmada da izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının

%27'sini idrar, %16'sını balgam, %15'ini yara yeri ve %42'sini diğer materyaller oluşturmaktadır.

P.aeruginosa çevre koşullarına kolay adaptasyonu, değişik virulans faktörleri ve antibiyotiklere karşı hızla geliştirdiği direnç ile hastane enfeksiyonu etkenleri arasında en fazla görülen fırsatçı patojen olma özelliğini devam ettirmektedir.

Kinolon grubu antibiyotikler etki spektrumları gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterileri kapsayacak şekilde oldukça genişlemiş etki spektrumlarına sahiptir. Bu tür antibiyotikler hem toplum kökenli enfeksiyonlarda hem de hastane kökenli enfeksiyonlarda özellikle gram negatif bakterilere karşı sık olarak kullanılmaktadır. Kinolon türevi antibiyotiklerin, geniş antibakteriyel spektrumları, oral alım ile gastrointestinal sistemden yüksek absorpsiyonu, dokulara iyi dağılımı, düşük yan etki insidansı nedeniyle her geçen gün kullanımları giderek artmaktadır. Kullanım alanının genişlemesi ve çeşitli konak faktörleri nedeniyle kinolonlara direnç artmaya devam etmektedir. Özellikle çoklu direnç gösteren bakterilerde kinolon direnci bu çoklu direnç paternleri içinde gittikçe artan düzeylerde yer almaktadır (55).

P.aeruginosa'da bulunan ilaç direnciyle ilgili ülkemizde ve yurt dışında literatürlerde pek çok yayına rastlamak mümkündür. Kinolonların in vitro aktivitesinin araştırıldığı çalışmalarda yıllar içinde oldukça farklı

duyarlılık oranları elde edilmiştir. *P.aeruginosa* izolatlarının direnç paternleri çalışmanın yapıldığı yıla, bölgeye, hastaneye ve hatta kliniğe göre değişkenlik göstermektedir.

Tablo 15: Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda *Pseudomonas* kökenlerinde belirlenen siprofloksasin ve ofloksasin direnç oranları (%).

Araştırmacı(kaynak)	Yıl	Sayı	CIP	OFX
Özgenç ve ark.(71)	1996	199	40	55
Mansuroğlu ve ark(74)	1998	94	13,8	20,2
Karabiber ve ark (93)	1999	87	32	
Akkurt ve ark (18)	1999	14		57
Akkurt ve ark (18)	2000	35		51
Pullukçu ve ark (91)	2000	69	27,5	
İnan ve ark (91)	2000	100	16	
Ergin ve ark (75)	2001	94		28
Vardar Ünlü ve ark (62)	2001	100	17	36
Pullukçu ve ark (91)	2001	122	33,9	
Pullukçu ve ark (91)	2002	80	15	
Ardıç ve ark (92)	2003	150	40	
Pullukçu ve ark (91)	2003	60	10	
Kaya ve ark (77)	2003	11		20
Nas ve ark (17)	2003	45	42	47
Çiftçi ve ark (6)	2004	101	29	
Pullukçu ve ark (91)	2004	90	24,1	
Azap ve ark (73)	2004	107	26	53
Pullukçu ve ark (86)	2004	298	32.6	
Algün ve ark (80)	2004	136		19,9
Can ve ark (72)	2005	29	38	38
Özmen ve ark(76)	2005	111	42	
Özkalay ve ark (79)	2005	154	23	
Kurultay ve ark (84)	2006	47	16	

CIP: Siprofloksasin OFX: Ofloksasin

Özgenç ve arkadaşlarının 1996 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, 199 *P. aeruginosa* kökeninin disk difüzyon testi ile siprofloksasine ve ofloksasine direnç oranları incelenmiş ve siprofloksasine direnci %40, ofloksasine direnci %55 olarak saptamışlardır (71).

Mansuroğlu ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışmaya göre ise yatan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* örneklerinin siprofloksasine direnç oranı %13.8, ofloksasine %20.2 olarak belirlenmiştir (74). Akkurt ve arkadaşları Samsun'da 1999 ile 2000 yılları arasında yoğun bakım ünitelerinden izole ettikleri *Pseudomonas* kökenlerinin ofloksasin direncini 1999 yılında %57, 2000 yılında %51 olarak saptamışlardır (18).

Pullukçu ve arkadaşlarının da 2000 ile 2004 yılları arasında yatan hastalardan toplanan örneklerden soyutlanan 421 *P.aeruginosa* ile yaptıkları bir çalışmada siprofloksasine 2000 ile 2001 yıllarında ortalama %30'lar civarında olan direnci 2002 ile 2004 yıllarında azaldığını ancak 2004 yılında tekrar %24.1'e çıktığını saptamışlardır (91).

Vardar ve arkadaşları 2001 yılında yayınladıkları çalışmada 100 *P.aeruginosa* kökeninde mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak direnci saptamışlar ve siprofloksasin direncini %17, ofloksasin direncini %36 olarak tespit etmişlerdir (62). Ergin ve arkadaşları ise 2001 yılında

yaptıkları çalışmada nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan 94 *P. aeruginosa* suşunda ofloksasin duyarlılığını E Test yöntemi ile %68, disk difüzyon yöntemi ile %74 olarak saptamışlar (75),

Kaya ve arkadaşları ise 2002-2003 yılları arasında izole ettikleri 135 örnekte 11 *P. aeruginosa* izole etmişler ve ofloksasine direnç oranını %20 olarak bildirmişlerdir (77). 2004 yılında Azap ve arkadaşları hastane enfeksiyonu olarak izole edilen 107 *P.aeruginosa* suşunun siprofloksasin direncini %26, ofloksasin direncini ise %53 olarak saptamışlardır (73).

Can ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınladıkları çalışmaya göre de, katater örneklerinden izole edilen 29 *P. aeruginosa* suşunun disk difüzyon yöntemi ile siprofloksasine ve ofloksasine direnç durumlarını %38 olarak belirlemişlerdir (72).

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler doğrultusunda Gazi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden izole edilen 39 *P.aeruginosa*'nın ofloksasine direnci Can ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer oranda yaklaşık %37 olarak saptanmıştır.

Çiftçi ve arkadaşları 2005 yılında klinik örneklerden izole edilen 101 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun siprofloksasine direnç oranını %29 olarak (6), Özmen ve arkadaşları ise 2005 yılında yatan hastalardan izole ettikleri 111 *Pseudomonas* suşunda siprofloksasine direnç oranını %42 olarak bulmuşlardır (76).

Florokinolonların geniş etki spektrumları, uygun farmakodinamik

özellikleri ile toplum kökenli pnömoni, akut sinüzit, üriner sistem enfeksiyonları, gonore ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında yaygın kullanımı sonucunda artan direnç sorunu ile karşılaşilmektedir. Altoparlak ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmaya göre %38, Tezer ve arkadaşlarının çalışmasına göre %36, Öztekin ve arkadaşları %31, Çetin ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada %23, 2003 yılında yaptıkları çalışmaya göre de %36 oranında direnç saptamışlardır (8,9,10,11).

Kurultay ve arkadaşları, 2006 yılında yoğun bakım ünitesinden izole ettikleri 47 *P.aeruginosa*'nın siprofloksasine direncini %16 olarak bildirilmiştir (84).

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada 100 *P.aeruginosa* suşunun siprofloksasin direnci %17 iken (62), Bengisun ve arkadaşlarının çalışmasında %19.7 olarak bildirilmiştir (61).

P.aeruginosa kökenlerinde ofloksasine dirençli suşların oranı ülkemizdeki bazı hastanelerde % 20'lerde iken bazı kliniklerde bu oran %60'lara ulaşabildiği bildirilmektedir. Yaptığımız çalışmada da ofloksasine direnç oranı ortalama %36 iken orta düzeyde direnç oranı %8 oranında tespit edilmiştir.

P. aeruginosa'nın kinolon direnciyle ilgili yurtdışı çalışmalarda da direnç oranları değişiklikler göstermekle birlikte % 35-70 arasında direnç belirtilmektedir. Karlowsky ve arkadaşlarının çalışmasında *Pseudomonas*

suşlarında yıllar içerisinde gelişen direnç oranları incelenmiş ve kinolon grubu antibiyotiklere karşı diğer grup antibiyotiklere göre dirençte hızlı bir artış olduğu ve MİK90 değerlerinde belirgin bir yükselme olduğu belirlenmiştir (78).

Tablo 16: Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda *Pseudomonas* kökenlerinde belirlenen siprofloksasin ve ofloksasin direnç oranları (%).

Araştırmacı(kaynak)	Yıl	Sayı	CIP	OFX
Pieboji ve ark (82)	1995-98	67		34
Smitha ve ark (81)	1995-2003	343	9	36,73
Hamze ve ark (94)	1998-2001	464	42,3	54,6
Rolston ve ark (88)	2000-03	100	20	67
Sekiguchi ve ark (89)	2003-04	214	100	51,4
Sekiguchi ve ark (89)	2003-04	70	100	62,9
Cavallo ve ark (90)	2004	450	15,11	
Raja ve ark (87)	2005	505	11,2	

CIP: Siprofloksasin OFX: Ofloksasin

Pieboji ve arkadaşları 1995 ile 1998 yılları arasında 67 *P.aeruginosa* suşunun %71,6'sını irin, %22,4'ünü idrar, %6'sını kan

örneklerinden izole etmişler ve ofloksasine direnç oranını disk difüzyon yöntemiyle % 34 olarak saptamışlardır (82). Hamze ve arkadaşları 1998 ile 2001 yılları arasında izole ettikleri 464 *P. aeruginosa* suşunun %39,3'ünü üriner örneklerden, %21,2'sini yara ve %16,5'ini göz örneklerinden elde etmişler ve ofloksasine direnci %54,6, siprofloksasine direncini %42,3 olarak saptamışlardır (94).

Smitha ve arkadaşları ise 1995 ve 2003 yılları arasında yapmış oldukları bir çalışmada izole ettikleri 343 *Pseudomonas* suşunun siprofloksasine direnç oranını %9, ofloksasine direnci ise %36,73 olarak bildirmişlerdir (81). Rolston ve arkadaşlarının 2000 ve 2003 yılları arasındaki çalışmalarında kanser hastalarından izole ettikleri 100 *P.aeruginosa* suşunun sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile siprofloksasine direnç oranını %20, ofloksasine ise %67 olarak saptamışlardır (88).

1993 ile 2002 yılları arasında yoğun bakım hastalarından ulusal sürveyans çalışması amacıyla izole edilen 13.999 *P. aeruginosa*'nın siprofloksasine antimikrobiyal direnci gittikçe artış gösterdiği %15'den %32'ye arttığı bildirilmiştir. İzolasyon yoğunluğu bakımından örnekler sırasıyla balgam, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat ve idrardan izole edilmiştir (85). Yaptığımız bu çalışmada da toplanan örneklerden idrar, balgam, yara yeri, bronkoalveolar lavaj örneklerinin ilk sıraları aldığı ve tespit edilen direncin de uyumluluk gösterdiği görülmektedir.

Sekiguchi ve arkadaşları 2003 ve 2004 yılları arasında Japonya'da

13 hastaneden yatan hastalardan izole ettikleri çoklu ilaç direnci gösteren 214 *P.aeruginosa*'nın siprofloksasin ve ofloksasin direncini %100 olarak tespit etmişler ve çoklu ilaç direnci göstermeyen 70 *P.aeruginosa*'nın siprofloksasine direncini %51.4, ofloksasin direncini ise %62.9 olarak saptamışlardır (89).

Cavallo ve arkadaşları 2004 yılında Fransa'da yaptıkları araştırmada, 450 *P. aeruginosa* suşunun siprofloksasine direnç oranını %15,11 olarak tespit etmişlerdir ve izolatların %31,6'sı idrar, %20,2'si balgam, %19,1'i yumuşak deri dokusu, %7.5'i bronkoalveolar lavaj ve %4,9'u kandan izole edilmiştir (90). Raja ve Singh adlı araştırmacılar 2005 yılında çeşitli örneklerden izole ettikleri 505 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun siprofloksasine direnç oranını %11,2 olarak saptamışlardır (87).

Farklı sonuçların bildirildiği yurtdışında yapılan bu çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, test ettiğimiz *P.aeruginosa* suşlarının ofloksasinin duyarlılık oranlarının orta düzeylerde olduğu görülmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında direncin yüksek oranlarda olduğu görülmektedir.

P.aeruginosa farklı gruptaki birçok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir ve her antibiyotik grubuna karşı direnç mekanizması farklıdır. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2002 ile 2003 yıllarında 664 farklı hastaya ait toplam

1603 *P.aeruginosa* izolatının 388' inin (%24,2) imipeneme, 606'sının (%37,8) meropeneme, 348'inin (21,7) seftazidime, 666'sının (%41,5) siprofloksasine, 783'ünün (%48,8) tobramisine, 591'inin (%36,8) aztreonama dirençli olduğu belirlenmiştir (Hacettepe Üniversitesi erişkin hastanesi yıllık kaydı).

Siprofloksasin ve ofloksasin duyarlılığının test edildiği çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında *P.aeruginosa* kökenlerinin ofloksasine olan direncinin siprofloksasine göre daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. Antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direnci arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. Değişik yerlerde ve değişik yıllarda yapılan çalışmaların birbirinden farklı antibiyotik direnci sonuçları, çalışmalarda da belirtildiği gibi bu antibiyotiklerin yoğun olarak kullanımına paralel olarak arttığını, bu nedenle hastaneler arasında farklılıklar görülebildiğini ortaya koymaktadır.

Kinolonlara dirençte asıl mekanizma DNA giraz enziminin mutasyonu olup, dış membran proteinlerinin özellikle de OmpF, OmpC defektleri ile oluşan dış membran geçirgenliğinin değişmesi ve aktif dışa pompalama sistemleri ile de kinolon direnci oluşmaktadır.

Yapılan bu çalışmada da, ofloksasine dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının *gyrA* proteininin kinolon direncini belirleyen bölgeyi kodlayan gen bölgesindeki mutasyonlar araştırılmıştır. Bu amaçla DNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır. DNA dizi analizi,

mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir. Önceden bilinen ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasına izin verir.

Pseudomonas aeruginosa suşlarında kinolon direncine sebep olduğu düşünülen ve üzerinde en çok çalışılan bölge DNA giraz geninin A altünitesidir. Bu gen bölgesindeki 83. kodonda Treonin (Thr) aminoasitinin İzolösün (Ile) aminoasidine değişimi kinolon direncinini belirtmektedir.

Sekiguchi ve arkadaşlarının 2007 yılına ait çalışmasında klinik örneklerden izole ettikleri 284 *P.aeruginosa* (214 çoklu ilaç direnci gösteren, 70 çoklu ilaç direnci göstermeyen) izolatının *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* genlerindeki aminoasit değişimleri incelenmiş ve 254'ünde (%89,4) *gyrA* bölgesinde Thr83→Ile , Asp87→Asn, Asp87→Gly ve Asp87→Tyr değişimleri saptanmıştır. Thr83→Ile değişimi 251 suшта (%88,4) tespit edilmiştir. 5 izolatta aminoasit değişimi gözlenmemiştir (89). 2003 yılında Güney Kore'de yapılan bir çalışmaya göre 103 siprofloksasin dirençli izolatın *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* bölgeleri incelenmiştir ve *gyrA* bölgesinde 101 izolatta (%98) Thr83→Ile, 5 izolatta (%4,8) Asp87→Asn , 5 izolatta (%4,8) Asp87→Tyr, 1 izolatta (%0,9) Asp87→Gly ve 1 izolatta (%0,9), Gln106→Leu değişimi saptanmıştır. 2 izolatta *gyrA* bölgesinde mutasyona rastlanmamıştır (12).

Japonya'da 1999 yılında florokinolonların direnç mekanizmasında hedef enzimlerin rolünü saptamak amacıyla yapılan bir araştırmada 150

P.aeruginosa izolatının *gyr* ve *par* bölgeleri incelendiğinde 119 izolatın *gyrA* bölgesinde Thr83→Ile, Thr83→Ala, Asp87→Asn, Asp87→Tyr, Asp87→Gly, Glu54→Lys, Ala67→Ser mutasyonları saptanmıştır (13).

Yurtdışında yapılan bu çalışmalarda yüksek oranlarda *gyrA* gen bölgesinde Thr83→Ile aminoasit değişimi gözlenmektedir. Yaptığımız bu çalışmada ise 39 *P.aeruginosa* izolatının *gyrA* gen bölgesinin 83. kodonunda Thr83→Ile aminoasit değişimi ofloksasin dirençli 5 izolatta (%12,82) tespit edilmiştir. İncelenen *gyrA* bölgesinin çeşitli kodonlarında da sessiz mutasyonlara rastlanmıştır. *gyrA* bölgesinin 84, 91,103, 110, 118, 132, 136, 137, 142,144 ve 150. kodonlarında sessiz mutasyonlara neden olan değişiklikler gösterilmiştir. Özellikle 132. kodonda His132→His değişimi 26 izolatta (% 66,6) gözlenmiştir. Tüm *P.aeruginosa* suşlarında, ofloksasine duyarlı ve dirençli, incelenen *gyrA* gen bölgesinin değişik kodonlarında farklı mutasyonlara rastlanmıştır (Tablo 13).

Tablo 17. *P.aeruginosa* izolatlarının *gyrA* gen bölgelerinde bulunan sessiz mutasyon tipleri

	Mutasyon tipi		aminoasit değişimi	nükleotid değişimi	İnsidansı no[%]
Dirençli	Sessiz mutasyon		Ala84→Ala	GCG→GCA	1(2,5)
			Val103→Val	GTA→GTC	3(7,6)
			Ala118→Ala	GCA→GCG	3(7,6)
			His132→His	CAC→CAT	10(25,6)
			Ala136→Ala	GCG→GCC	3(7,6)
			Asp137→Asp	GAC→GAT	1(2,5)
			Asp144→Asp	GAC→GAT	3(7,6)
			Asp150→Asp	GAT→GAC	3(7,6)
Duyarlı	Sessiz Mutasyon		Arg91→Arg	CGC→CGT	1(2,5)
			Val103→Val	GTA→GTC	2(5,1)
			Gly110→Gly	GGT→GGC	2(5,1)
			Ala118→Ala	GCA→GCG	2(5,1)
			His132→His	CAC→CAT	16(41)
			Ala136→Ala	GCG→GCC	2(5,1)
			Thr142→Thr	ACC→ACG	1(2,5)
Ala (Alanin)	Val (Valin)	His (Histidin)	Asp (Aspartik asit)		
Gly (Gilislin)	Thr (Treonin)	Arg (Arginin)			

Japonya'da 1999 yılında yapılan çalışmada 335 *P.aeruginosa* suşu ile çalışılmış ve *gyrA* bölgesindeki aminoasit değişimleri saptanmıştır. 243 izolatta (%72,5) değişim gözlenmemiştir. Thr83→Ile dönüşümü 63 örnekte (%18,8) tespit edilmiş ve Thr83→Ile değişimi gözlenen suşlarda yüksek düzeyde florokinolon direnci gösterilmiştir (15). Yaptığımız bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre *gyrA* gen bölgesinin 83. kodonunda meydana gelen Thr83→Ile mutasyonu benzer değerler göstermektedir.

Higgins ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladıkları araştırmalarına göre klinik örneklerden izole ettikleri 58 *P.aeruginosa* suşunun 40'ında (%68,9) Thr83→Ile mutasyonu söz konusudur. 10 izolatta ise değişim gözlenmemiştir. 12 izolatta ikili mutasyonlara rastlanmıştır (95). Çalışmamızda da incelenen *gyrA* gen bölgesinde çok sayıda ikili mutasyonlara rastlanmaktadır (Tablo 14).

Siprofloksasine dirençli 30 *P.aeruginosa* izolatlarının *gyrA*, *gyrB* ve *parC* genlerindeki mutasyonlarının araştırıldığı Fransa'da yapılan başka bir çalışmada *gyrA* gen bölgesinde Thr83→Ile nokta mutasyonu 27 izolatta (%90) gösterilmiştir. 3 izolatta ise mutasyon saptanamamıştır. Sadece 1 izolatta 87. kodonda Asp87→Gly mutasyonu belirlenmiştir (96). Daha önce rapor edilen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada florokinolon dirençli 22 *P.aeruginosa* suşunun (97) 13'ünde ve 18 suşun (98) 10'unda *gyrA* bölgesinin 83. kodonunda tekli mutasyon

(Thr83→Ile), 22 suşun 1'inde ve 18 suşun 1'inde 87. kodonda tekli mutasyona rastlanmıştır. Nakano ve arkadaşlarının (97) yaptıkları çalışmada 83 ve 87. kodonda ikili mutasyon gözlenmemiştir.

1993 yılında Yonezawa ve arkadaşlarının çalışmasında klinik örneklerden izole edilen 15 *P.aeruginosa* kökenlerinin çeşitli kinolonlara duyarlılıklarını tespit etmişler ve kinolon dirençli 15 suşun *gyrA* gen bölgesindeki mutasyonlarını incelemişlerdir. 83. kodonda Thr83→Ile değişimi 14 izolatta gözlenmiş, ayrıca 3 izolatta Asp87→Asn ve 1 izolatta Asp87→His, Asp87→Gly aminoasit değişimi bulmuşlardır. Çalışmalarında ikili mutasyonlara da rastlamışlardır. Bunun nedeninin yüksek düzeydeki kinolon direncinden kaynaklandığını belirtmektedirler(14). Yaptığımız çalışmada elde edilen verilere göre rastlanan çok sayıda sessiz mutasyonların dirençli suşlarda artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, *P. aeruginosa* izolatlarının direnç paternlerinin çalışmanın yapıldığı yıla, bölgeye, hastaneye ve hatta kliniğe göre değişkenlik gösterebileceği bilindiğinden, bu direnç oranlarının her yıl her hastanede saptanmasının önemi vardır. Hastanemizden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında ülke genelinde ve tüm dünyada olduğu gibi yüksek oranda antimikrobiyal direnç ve çoğul direnç özellikleri görülmektedir. Bu direnç mekanizmalarının bilinmesi ve yayılımının önlenmesi önemlidir. Yaptığımız bu çalışma *gyrA* gen bölgesinin Ülkemizde *Pseudomonas*

aeruginosa suşlarında kinolon direnci ile ilişkili olarak yapılan araştırdığımız kadarıyla ilk çalışmadır. *Pseudomonas aeruginosa*'da görülen yüksek antimikrobiyal direnç nedeniyle bu antimikrobiyal direncin aydınlatılabilmesi için bu gibi çalışmalara gerek duyulmaktadır. Akılcı antibiyotik kullanımı politikaları belirleyip, belirlenen kurallara sıkı uyumu sağlamak zorunludur. Direnç özelliklerinin belirlenmesine yönelik epidemiyolojik çalışmalar ampirik tedaviye yol göstermesi açısından yararlıdır. Dirençle ilişkili olabilecek diğer gen bölgelerinin incelenmesine yönelik yapılan moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu veriler ışığında ve hastane enfeksiyonları kontrol komitelerinin önerileri doğrultusunda antibiyotik kullanılmalıdır.

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa hastalarda ciddi seyirli enfeksiyonlara yol açan ve antibiyotik direncinin sorun olduğu bir patojendir. Son yıllarda, hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *P. aeruginosa*'da antimikrobiyallere karşı direnç artış göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, *P. aeruginosa* suşlarında kinolon direncinin konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanmasıdır.

Hastanemize gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 93 nonfermentatif bakteri konvansiyonel yöntemlerle tiplendirilmiştir. Tiplendirilen 39 *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu *P. aeruginosa* suşlarına CLSI önerilerine uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile ofloksasine olan duyarlılıkları araştırılmıştır. *P. aeruginosa*'da kinolon direncine sebep olduğu düşünülen ve üzerinde en çok çalışılan bölge DNA giraz geninin A altünitesidir. Ofloksasine duyarlı ve dirençli tüm *P. aeruginosa* suşlarına *gyrA* gen bölgesinin dizi analizi yapılarak moleküler olarak incelenmiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre, agar dilüsyon metodu ile ofloksasine duyarlılıkları araştırılan 39 *P. aeruginosa* suşunun

14'ünde (%35,89) direnç görülürken, orta düzeyde direnç oranı 3 suшта (%7,69) tespit edilmiştir.

gyrA geninde yapılan dizi analizinde farklı kodonlarda mutasyonlar saptanmıştır. *gyrA* gen bölgesinin dizi analizi sonuçları incelendiğinde, 83. kodonda treonin aminosidinin izolösün aminoasidine dönüşümü sonucu oluşan mutasyon yalnız ofloksasine dirençli 5 suшта (%12,82) saptanmıştır. Duyarlı suşlarda da çok sayıda sessiz mutasyon gözlenmiştir.

gyrA geninde incelenen diğer kodonlarda da çok sayıda sessiz mutasyonlara rastlanmıştır. Çalıştığımız örneklerde en sık rastlanan sessiz mutasyon 132. kodonda gösterilmiştir. 6 *P. aeruginosa* (%15,38) suşunda ise hiçbir değişikliğe rastlanmamıştır.

P. aeruginosa suşlarında kinolon direncinin *gyrA* gen bölgesinin moleküler analizi ile değerlendirildiği bilindiği kadarıyla ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

P.aeruginosa'ya yüksek direnç görülmesi nedeniyle antimikrobiyal direncin aydınlatılabilmesi için bu gibi çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Dirençle ilişkili olabilecek *gyrB*, *parC* ve *parD* gen bölgelerinin araştırılması, direncin moleküler özelliklerinin ortaya konulabilmesi açısından gereklidir.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is responsible for serious infections in critically ill patients. In recent years, increasing antimicrobial resistance in both nosocomial and community acquired *P. aeruginosa* isolates is alarming.

The aim of study was to detect the quinolone resistance of *P. aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens in our hospital, by conventional and molecular methods. Ninety – three nonfermentative bacterial isolates were included in the study. Thirty – nine of them was identified as *P. aeruginosa* by using conventional methods. Ofloxacin susceptibility of the strains were assessed by using agar dilution method according to the recommendations of CLSI and DNA sequencing of *gyrA* was done.

Fourteen of 39 (35,89%) *P. aeruginosa* strains were resistant to ofloxacin. Further 3 (7,69%) strains were found intermediate – resistant. The substitution of threonine to isoleucine was observed in

5 of 14 (35.71%) quinolone resistant strains. Various silent mutations had been detected in quinolone resistant and susceptible strains, where codon 132 was most frequently affected. None of the susceptible strains had missense or nonsense mutations in *gyrA*. Six of 39 (12,82%) of the strains did not have any *gyrA* mutations.

These data confirm that the primary mechanism of quinolone resistance in *P. aeruginosa* is mediated through target site alterations, specifically leading to the amino acid substitution of an isoleucine for a threonine in *gyrA*.

To our knowledge this is the first study which the quinolone resistance examined by molecular analyzes in the *gyrA* gene of the *P. aeruginosa* in Turkey.

We requirement new studies for clarifying the antimicrobial resistance because of the high level resistance in *P. aeruginosa*. The gene region must examined which can be related with resistance this is necessary for showing molecular characteristic.

KAYNAKLAR

1. Koçoğlu F, Saygı G, Bakıcı MZ. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobik duyarlılıklarının belirlenmesinde agar difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült. 1996;30-251.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S11 6, Wayne (2003).
3. Ayyıldız A, Kocazeybek B, Arıtürk S. Değişik klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2002;16(1):1-3.
4. Cevahir N, Kaleli İ, Demir M, Öztürk S, Mete E. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direncinin belirlenmesi. ANKEM Derg 2003;17(1):16-9.
5. Erdemoğlu A, Emekdaş G, Kocabeyoğlu Ö, Diler M, Göksu GT. Klinik ve poliklinik hastaların idrarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. Ankem Derg 1999;13(1):39-43.
6. Çiftçi İH, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005;35(2):98-102.
7. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2004. www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html
8. Durmaz Çetin B, Özcan N, Oktar M, Hamsan H, Gül M. Yara ve abse örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılığındaki üç yıllık değişim. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34(4):244-7.
9. Altıparlak Ü, Özkurt S, Erol S. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkilerinin araştırılması, Ankem Derg 2003;17:46.

10. Tezer ve ark. Yağcı D, Altınsoy A ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *P.aureginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. X.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı 2003;13-49.
- 11.Öztekin F, Türkay V, Devrim S . Reanimasyon kliniğinde çeşitli antibiyotiklerin *P.aeruginosa*'ya etkinliği. ANKEM Derg 1999;13:122.
12. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the *gyrA* and *gyrB* subunits of topoisomerase II and the *parC* and *parE* subunits of Topoisomerase IV in ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Int J Antimicrob Agents 2005;25:290-95.
13. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone resistant Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in 1998 and 1999:Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolone Resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(8):2263-68.
14. Yonezawa M,Takahata NM, Watanabe Y,Narita H. DNA Gyrase *gyrA* Mutations in Quinolone Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39(9):1970-72.
15. Takenouchi T, Sakagawa E, Sugawara M. Detection of *gyrA* Mutations among 335 *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in Japan and Their Susceptibilities to Fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(2): 406-9.
16. Gültekin B, Eyigör M, Aydın N: Klinik örneklerden izole edilen *pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2004;18(1):1-4.
17. Öksüz L, Genç L, Günel S, Öngen B, Gürler S. 2002 yılında kan kültüründen izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere direnç durumları. Ankem derg 2003;17(2):89.
18. Akkurt L, Havuz SG, Uyar Y, Karadağ A, Esen Ş, Günaydın M. 1999-2000 yıllarında yoğun bakım ünitesinden izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci. Ankem Derg 2002;16(1):14-17.
19. Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif nonfermentatif basiller ve antibiyotiklere direnç sorunu. Hastane İnfeksiyon Derg 1999;3(1):33-9.

20. Davis DB, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg HS, Wood WB. 1968. Microbiology. 756-757., 774 s. Hober Medical Division,
21. Wilson W,Sande M. Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi.İstanbul: Nobel tıp kitabevi;2004;567-578
22. Stephen H, Gillespie and Peter M. Hawkey. Principles and Practice of clinical bacteriology second edition, John Wiley-Sons,İtd; 2006.427-435
23. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn W J, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997. p.253-309
24. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; 2004. p. 3.3.2-3.3.2.13 (sınıflandırma için)
25. Frobisher M. Fundamentals of Microbiology.USA: W.B.Saunders Company; 1968. s.457.
26. Ilgaz A. Özel Mikrobiyoloji Ankara:Medison Yayınları;1999. s. 91-96.
27. Wilson, S. G. and Miles, A. A. 1964. Principles of Bacteriology and Immunity. 636-643 Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
28. Gowan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoïd Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiological Reviews 1996; 60:539-74.
29. Pollack M. P. aeruginosa: Mandell GL, Douglas RL, Bennett JE, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York:Churchill Livingstone; 1995. p.1980-2003.
30. Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis.Respiration 2000; 67:3-8.
31. Akova M. Pseudomonas aeruginosa infeksiyonları. Flora 1997;1:61-65.

32. Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW eds. *Infectious Diseases*. Second ed., Toronto: 2004; s. 1733-1748.
33. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Barış Kitabevi; 1995 . s. 161-178.
34. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterisation of the *Pseudomonas aeruginosa* *lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991; 173: 3000-09.
35. Pearson JP, Gray KM, Passador L, Williams P, Pritchard DI. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 197-201.
36. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; 46: 207-214.
37. Hooi DSW, Bycroft BW, Chhabra SR, et al. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* 2004; 72: 6463-6470.
38. Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67:3-8.
39. Christopher A. Ohi, Matthew Pollack. Infections Due to *Pseudomonas* Species and Related Organisms. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed.
40. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999; 284: 1322-28.
41. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 6th ed., Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005: 2587-2614.
42. Bonten M, Weinstein R. Transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units don't go near the water. *Critical Care Medicine* 2002; 30:10-12.

43. Yalçın N. Nozokomiyal Gram-negatif çomak infeksiyonları. Klimik Derg 2000 özel sayı: 23-25.
44. Erdem B. Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. İçinde: Ustaçelebi Ş ed. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 551-558
45. Gülay Z, Sümerkan B. Antibiyotik Direnci: Mekanizma fenotip ilişkisi ve bildirimi. 5. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, İstanbul 2002: 43-67.
46. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. Clin Infectious Disease 1989 ; 27(1): 93-99.
47. Vahaboğlu H, Akhan SÇ. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. s.1608- 16
48. Vahaboğlu H. Yoğun bakım ünitesinde Gram negatif bakteriler ve direnç sorunu. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Adana, 2001; s 95.
49. Nikaido H. Antibiotik resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. Clinical Infectious Diseases 1998; 27 (1): 32-41.
50. George A. Jacoby. Mechanism of resistance to quinolones. Clinical Infectious Diseases 2005; 41:120-6.
51. Qwens RCJr, Ambrose PG. Clinical use of the fluoroquinolones Med Clin North Am 84:1447-2000
52. Melli M. " Kinolonlar "Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel sayısı , 2004;2 (2): 154 –161
53. Leblebicioğlu H, Yeni kinolonlarda mikrobiyolojik ve klinik etkinlik Ankem derg 2002;16(3): 226-231.

54. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer quinolones. Clin Infect Dis 2001;31(2):24-8.
55. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001;32:9
56. George A. Jacoby, Mechanisms of Resistance to Quinolones Clinical Infectious Diseases 2005; 41:120–126
57. Woodford N, Johnson AP, Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications; 617-635
58. Hentzer M, Givskov M: Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections, J Clin Invest 2003;112(9):1300-7.
59. Bambeke FV, Balzi E, Tulkens PM: Antibiotic efflux pumps, Biochem Pharmacol 2000; 60:45.
60. Poole K: Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in gram negative bacteria, Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2222.
61. Bengisun JS, Palabıyıkolu , Ihan F, Kutlutürk M. Gram negatif bakterilerde siprofloksasin ve levofloksasin direnci, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001;31:212.
62. Vardar-Ünlü G, Ünlü M. Çeşitli örneklerden soyutlanan Pseudomonas aeruginosa kökenlerinin levofloksasin, siprofloksasin ve ofloksasine karşı in vitro duyarlılığı, Enfeksiyon Derg 2001;15:311-314.
63. Altınok B. Klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının SDS-PAGE protein profilleri, antibiyotik duyarlılıkları, biyokimyasal ve piyosin tiplendirimi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi;1999.
64. Çavuşoğlu C. Mycobacterium Tuberculosis'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri: 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003;369-386.
65. Persing D, Fred C. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar,

2006,137-159

66. Yağcı A. Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı, 2001;149-160

67. Aydın K, Çaylan R, Köksal , Volkan S, Öksüz R. Pseudomonas aeruginosa suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı, Hastane enfeksiyonları Derg 2000;4:92.

68. Akalın H. XIII. Türk klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı, 2007

69. Yüce A. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, Klimik Dergisi, 2001;14:41-46

70. Aydın F. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara:Ankara Üniversitesi;2001.

71. Özgenç O, Urbarlı A. Pseudomonas aeruginosa kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması, İnf Derg 2002;16(2):179-182.

72. Can B, Aydın S. Katater örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobik maddelere direnç durumları, Ankem Derg 2005;19(1):22-24.

73. Azap Ö, Timurkaynak F. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen non-fermentatif gram negatif bakterilerde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin in vitro etkinliğinin karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2004;57(4):189-194

74. Mansuroğlu H, Taysı B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının florokinolonlara in vitro duyarlılıkları, Mikrobiyoloji bülteni 1998;32:301-307

75. Ergin F. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan Pseudomonas aeruginosa suşlarının antibiyotik duyarlılığını belirlemede E-Test ve Disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Enfeksiyon Derg 2001;15:473-476

76. Özmen E, Uluğ M. Yatan hastalardan izole edilen gram negatif nonfermantatif çomakların antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. Ankem derg 2006;20(Ek-1)
77. Kaya S, Cicioğlu B. Çocuk hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik direnç oranları. Fırat Tıp Derg 2007;12(1):34-36
78. Karlowsky JA, Draghi DC. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1681-1688
79. Özkalay N, Ağuş N. *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılığındaki değişim. Ankem Derg 2006;20(3):159-163
80. Algün Ü, Arısoy A. The resistance of *pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. Indian Journal of medical Microbiology 2004;22(2): 112-4
81. Smitha S, Lalitha P, Oraina VN, Srinivasan M. Susceptibility trends of *Pseudomonas* species from corneal ulcers, Indian Journal of Medical Microbiology 2005;23(3):168-171
82. Pieboji JG, Shiro SK: Antimicrobial activity against gram negative bacilli from Yaounde Central Hospital, African Health Sciences 2006;6(4):232-35
83. Şengöz G, Yıldırım F. Yoğun bakım ünitesinde izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* cinsi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının araştırılması. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Antalya 2005:286.
84. Kurultay N, Şener G. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıkları, Klimik Derg 2000;20(2):50-54
85. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(12):4606-10.

86. Pullukçu H, Taşbakan M, Aydemir Ş. İdrar kültürlerinden soyutlanan bakteriler ve çeşitli antibiyotiklere invitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi, *Ankem Derg* 2006;20(1):26-30.
87. Raja SN, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect* 2007;40:45-49.
88. Rolston KVI, Kontoyiannis DP, Yadegarynia D, Raad II. Nonfermentative gram negative bacilli in cancer patients: increasing frequency of infection and antimicrobial susceptibility of clinical isolates to fluoroquinolones. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005;51:215-18.
89. Sekiguchi J, Asagi T, Akiyama TM, Kasaiş A, et al. Outbreaks of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J Clin Microbiol* 2007;45(3):979-989.
90. Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, fabre R, Delvallez MR. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1021-24.
91. Pullukçu H, Aydemir Ş, Turhan A, Tunger A, Özinel MA, Ulusoy S. Normalde steril örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere invitro duyarlılıkları: Beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *İnfeksiyon dergisi* 2006;20(2):111-16.
92. Ardiç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2004;18(3):145-8.
93. Karabiber N, Karahan M, Akıncı E, Kılıç H. 1998 yılı hastane izolatu olan Gram negatif çomakların invitro antibiyotik duyarlılığı. *ANKEM Derg* 1999;13:121.
94. Hamze M, Dabboussi F, Izard D. A 4-year study of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics (1998–2001) in northern Lebanon. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2004;34(7):321-324.
95. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in *gyrA*, *parC*, *MexR* and *NfxB* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J*

Antimicrob Agents 2003;21:409-413.

96. Mounneimne H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. Type II Topoisomerase Mutations in Ciprofloxacin Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(1):62-66.

97. Nakano M, Deguchi T, Kawamura T, Yasuda M, Kimura M, Okano Y, Kawada Y. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2289-91.

98. Soussy C, Wolfson JS, Ng EY, Hooper C. Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2588-92.

99. İnce D. Nükleik asit sentezini etkileyen antibakteriyeller: Kinolonlar. Ankem Derg 2003;17(3):208-211.