

**SEFTAZİDİM DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
İZOLATLARINDA BETA LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Halil ER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

TIBBİ MKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2013

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEFTAZİDİM DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
İZOLATLARINDA BETA LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Halil ER

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

2013 - AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Seftazidim Dirençli *Pseudomonas aeruginosa*
İzolatlarında Beta Laktamazların Moleküler
Epidemiyolojisi

Tezi Hazırlayan : Arş. Grv. Dr. Halil ER

Tez Savunma Tarihi : 02.05.2013

Tez Kabul Tarihi : 02.05.2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

İş bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan
Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

Üye
Prof. Dr. Tülay KÖKEN

Üye
Doç. Dr. Reşit KÖKEN

DEKAN
Prof. Dr. Ahmet SONGUR

Bu tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 11.TUS.11 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana her konuda yol gösteren, tez konumun belirlenmesi ve tezimin hazırlanması sırasında deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e, eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm bilgi ve deneyimlerinden sürekli faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülşah AŞIK'a, daha önce birlikte çalıştığım eğitimde çok katkısı olan mesleki tecrübelerini benimle paylaşan bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya, Sayın Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye, Sayın Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye, Sayın Doç. Dr. Özlem MİMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Rotasyonlarım sırasında eğitimime katkıları dolayısıyla Sayın Prof.Dr. Tülay KÖKEN'e, Sayın Doç.Dr. Reşit KÖKEN'e, Doç.Dr. Tuna DEMİRDAL'a, tez çalışmalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, güler yüzü, fedakarlığı, iyi niyeti, hayata pozitif bakış açısı hiç eksik olmayan, tüm sorunlarımı paylaştığım, bir ablaya ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan Sayın Arş. Grv. Dr. Özlem YOLDAŞ'a, çalışmamın büyük bölümünde desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Grv. Cengiz DEMİR'e, asistanlık sürem boyunca güzel arkadaşlıkları ve çalışmalarım sırasında destekleri için mikrobiyoloji ailesine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi, onur ve gurur duyduğum annem ve babama, sonsuz özveri ve hoşgörü gösteren, desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Halil ER
AFYONKARAHİSAR-2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR	IV
TABLolar ÇİZELGESİ.....	V
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
2.1.1. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ	3
2.1.2. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ	3
2.1.3. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	4
2.1.4. EPİDEMİYOLOJİ.....	4
2.1.5. PATOGENEZİ.....	5
2.1.6. VİRULANS FAKTÖRLERİ	6
2.2.6.1. BAKTERİYEL FAKTÖRLER	7
2.2.6.1.1. YÜZEY ADEZİNLERİ.....	7
2.2.6.1.2. ALGİNAT.....	7
2.2.6.1.3. PİGMENT.....	7
2.2.6.1.4. HEMOLİZİNLER	8
2.2.6.1.5. EKZOTOKSİN A.....	8
2.2.6.1.6. EKZOENZİM S	8
2.2.6.1.7. PROTEAZLAR.....	8
2.2.6.1.8. ENDOTOKSİN	9
2.1.6.2. KONAK FAKTÖRLERİ.....	9
2.1.7. OLUŞTURDUĞU ENFEKSİYONLAR	10
2.1.8. FİZİKSEL VE KİMYASAL AJANLARA DİRENÇ	12
2.1.9. LABORATUVAR TANISI.....	12
2.1.10. ANTİPSEUDOMONAL ANTİBİYOTİKLER	13
2.2. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> 'DA İLAÇ DİRENCİ.....	14
2.2.1. ATIM POMPALARI.....	14
2.2.2. DIŞ MEMBRAN GEÇİRGENLİĞİ	15
2.2.3. BETA LAKTAMAZLAR	16
2.2.3.1. SINIF A BETA LAKTAMAZLAR	17
2.2.3.2. SINIF B BETA LAKTAMAZLAR	17
2.2.3.3. SINIF C BETA LAKTAMAZLAR	18
2.2.3.4. SINIF D BETA LAKTAMAZLAR	18
2.2.3.5. VIM	19
2.2.3.6. IMP	20
2.2.3.7. GES	20
2.2.3.8. OXA	21

2.2.3.9. PER.....	21
2.2.3.10. KPC	22
2.2.3.11. DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> İZOLATLARI	24
3.2. BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI.....	24
3.3. SUŞLARIN İDENTİFİKASYONU.....	25
3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	26
3.4.1. DİSK DİFÜZYON	26
3.4.2. E TEST	27
3.5. İNDÜKLENEBİLİR BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ SAPTANMASI (ÇİFT DİSK İNDÜKSİYON)	28
3.6. GSBL ÇİFT DİSK SİNERJİ TESTİ	28
3.7. METALLO BETA LAKTAMAZLARIN FENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI.....	28
3.8. DİRENÇ ENZİMLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE SAPTANMASI.....	29
3.8.1. KALIP DNA HAZIRLANMASI.....	29
3.8.2. PRİMERLERİN HAZIRLANIŞI.....	30
3.8.3. PZR OPTİMİZASYONU	30
3.8.4. İZOLATLARIN MOLEKÜLER OLARAK DOĞRULANMASI	30
3.8.5. PZR İLE OXA GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU	31
3.8.6. PZR İLE PER GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU.....	31
3.8.7. PZR İLE GES GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU	32
3.8.8. PZR İLE VIM VE IMP GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU	32
3.8.9. PZR İLE KPC GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU	33
3.8.10. AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZ.....	33
3.9. DİZİ ANALİZİ	34
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ.....	60
7. ÖZET.....	62
8. SUMMARY.....	63
9. KAYNAKLAR.....	64

KISALTMALAR

ARDS	: Akut Respiratuar Distres Sendromu
ATCC	: American Type Culture Collection
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DIC	: Dissemine İnvasküler Koagölasyon
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EF	: Elongasyon Faktörü
EMB	: Eozin Metilen Blue Agar
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
İBL	: İndüklenebilir Beta Laktamaz
IL	: İnterlökin
MBL	: Metallo Beta Laktamaz
MHA	: Mueller Hinton Agar
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGF	: Transforming Growth Faktör
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TSİ	: Triple Sugar Iron
YBÜ	: Yoğun Bakım Üniteleri

TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Tablo I. Beta laktamazların sınıflandırılması	16
Tablo II. Klinik önemi olan β -laktamazlar.....	19
Tablo III. Beta laktamazların substrat profili.....	23
Tablo IV. PZR reaksiyon karışımı	30
Tablo V. 23S RNA gen bölgesi PZR protokolü	31
Tablo VI. OXA gen bölgesi PZR protokolü.....	31
Tablo VII. PER gen bölgesi PZR protokolü	32
Tablo VIII. GES gen bölgesi PZR protokolü.....	32
Tablo IX. VIM ve IMP gen bölgesi PZR protokolü	33
Tablo X. KPC gen bölgesi PZR protokolü	33
Tablo XI. Örneklerin klinik dağılımı	36
Tablo XII. Şuşların örnek dağılımı.....	36
Tablo XIII. Seftazidim ve imipenem MİK dağılımları.....	37
Tablo XIV. Antibiyotik duyarlılık ve direnç oranları.....	38
Tablo XV. Antibiyotik direncini yıllara göre dağılımı	38
Tablo XVII. Örnek tipi dağılımı açısından yurt içi ve yurt dışı veriler	51
Tablo XVIII. Yurt içi ve yurt dışı çalışmalarda bildirilen direnç oranları.....	55
Tablo XIX. Hastanemizde daha önce yapılan iki araştırmanın antibiyotik direnç oranları.....	56

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MHA’da pigment görünümü	35
Şekil 2. MHA’da çift disk indüksiyon yöntemi	39
Şekil 3. MBL E Test	40
Şekil 4. Direnç genlerinin jel elektroforez görünümü	41
Şekil 5. VIM geni dizi analizi sonuçları	42
Şekil 6. OXA geni dizi analizi sonuçları	42
Şekil 7. GES geni dizi analizi sonuçları	43
Şekil 8. ABC transporter permease geni dizi analizi sonuçları.....	43

1. GİRİŞ

Pseudomonas aureginosa doğada çok yaygın olarak bulunur ve organik materyalin yeniden düzenlenmesinde, önemli rol oynar. Çoğu türler bitki ve hayvanlar için patojendir. Çoğu *Pseudomonas*'lar insanları enfekte etmekle birlikte, bazıları özellikle savunma sistemi zayıflamış kişilerde önemli fırsatçı patojendir. Mekanik ventilasyon altındaki erişkinler veya nötropenik hastalar, özellikle geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi sırasında veya sonrasında *P.aeruginosa*'ya bağlı ventilatör kaynaklı veya diğer pnömoniler açısından büyük risk altındadırlar (1).

P.aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktam; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır (2, 3).

Beta laktam antibiyotikler, kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (4).

P.aeruginosa pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik dirençlidir. Bu intrinsik direnç sebepleri arasında; ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması sayılabilir. Ayrıca *P.aeruginosa*'da beta laktamaz enzimlerinin varlığı antibiyotik direncinden sorumludur (5).

Beta laktamazlar, beta laktam grubu antibiyotiklerde bulunan beta laktam halkasının amid bağlarına etki ederler ve bu bağları parçalarlar (6). Beta laktamazlar plazmit veya kromozomal kökenli bakteriyel enzimler olup, bakteride beta laktamaz sentezi konstitif veya indüklenebilir düzeyde olabilir. Gram-negatif bakterilerde

periplazmik alanda bulunan enzim, gram-pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır (7).

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yatmakta olan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespit edilmesi, PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA gibi direnç enzimlerinin fenotipik ve genotipik olarak saptanması, enzim taşıdığı belirlenen izolatların dizi analizlerinin yapılması ve alt türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa toprakta ve suda yaşayan gram negatif, nonfermentatif, aerop basildir. Doğada çok yaygın bulunur ve organik materyallerin yeniden düzenlenmesinde önemli rol oynar. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları, konağın savunma sisteminin kırılmış olması ve bakterilerin sık kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli olmaları nedeniyle ağır seyrederek ve tedavisi zordur (1).

2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa 1,5 - 3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, tek başına, ikili veya bazen kısa zincirler halinde bulunan, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır. Çoğu kez uçlarında bir veya birkaç kirpiği bulunur ve çok hareketlidir. Gram boyama ile kolay ve Gram (-) boyanırlar (2).

2.1.2. Kültür Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa zorunlu aeroptur. Üremek için basit besin maddelerine ihtiyaç duyduğundan kanlı agar, MacConkey agar gibi birçok besiyerinde kolayca ürer ve kolonileri tatlı veya üzüm benzeri koku oluşturur (8, 9). En iyi üreme sıcaklığı 37°C'dir ancak 42°C'de de üreyebilir. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemoliz yapar (1). Kolonileri 3 - 5 mm büyüklüğünde, kenarları düzensiz görünümündedir (2). Kistik fibrozlu hastaların kültürlerinde, bir ekzopolisakkarid olan alginatın aşırı üretilmesi nedeniyle mukoid koloniler oluşturan *P.aeruginosa* üretilmektedir (8). Kültürleri, yeşil renk oluşturan piyosiyenin adı verilen çözünür fenazin pigmenti üretir. Piyosiyenin dışında bakteri kırmızı renk veren piyorubin pigmenti, kahverengi renk veren piyomelanin pigmenti ve sarı-yeşil renk veren piyoverdin pigmenti oluşturur (2).

2.1.3. Biyokimyasal Özellikleri

P.aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterir. Oksidaz, sitrat ve L-arginin dihidrolaz pozitifdir. Nitratı nitrite çevirirler. L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatifdir (1). İndol ve H₂S oluşturmaz. Metil kırmızısı ve Voges Proskauer olumsuzdur. *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* aynı bakterilerin diğer kökenlerine etki ederek onları eriten bakterosinler yaparlar (2).

2.1.4. Epidemiyoloji

Pseudomonas farklı çevresel yerleşim gösteren fırsatçı bir patojendir. Havadan, sudan, bitki ve hayvanlardan izole edilebilir. Üremesi için çok az besin maddesine ihtiyaç duyar, distile su içinde bile üreyebilir. Bu özellikleri *P.aeruginosa*'yı çok etkili bir fırsatçı patojen yapar (1).

P.aeruginosa fırsatçı patojen enfeksiyonlara neden olmaktadır. Sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa sebep olur. Sağlıklı bireylerde perine, dış kulak yolu, aksilla, alt gastrointestinal sistem gibi nemli alanlarda kolonize olabilir. Sağlıklı kişilerin derisinde %0-2, burun mukozasında %0-3,3, boğazında %0-6,6, dışkıında %2,6-24 oranında bulunabilir. Yanık, kanser kemoterapisi, HIV enfeksiyonu, nötropeni gibi nedenlerle normal savunma mekanizmaları bozulmalarda; uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımıyla mikrobiyal florası değişenlerde; kistik fibrozisteki solunum sistemi değişiklikleri gibi savunma mekanizmalarında değişiklik olanlarda ve organizmanın doğal temizleme mekanizmalarının bozulmasına yol açan üriner kateter, entübasyon uygulananlarda bu kolonizasyon enfeksiyona dönüşebilir. Risk grubundaki kişilerde enfeksiyon oluşmasında bir faktör de ortam koşullarıdır. Lavabo, mutfak malzemeleri, ventilatör, endoskop, dezenfektanlar gibi nemli ortamda kolayca üreyebilmesi nedeniyle hastane ortamında bol bulunurlar. Hastane dışı enfeksiyonlardan ise genellikle yüzme havuzları, küvetler, jakuzi, sauna, kontakt lens ve solüsyonları sorumludur (10).

P.aeruginosa konağın deri savunmasının tahrip olduğu geniş yanıklı hastalarda, kistik fibrozis gibi solunum yolu hastalığı bulunan olgularda, bağışıklığı baskılanmış olgularda, katater takılmış olgularda enfeksiyonlara neden olur (11).

Olson ve ark. yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastalarda *P. aeruginosa* kolonizasyonu oluştuğunu göstermişlerdir. Yoğun bakım hastalarının taranması sonucu 240 hastada *P.aeruginosa* kolonizasyonu saptanmışlardır. Bu örneklerin 50'sinin karbapenemlere dirençli olduğu ve metallo beta laktamaz ürettiği bulunmuştur. Bu 50 izolatın %60'ı diyabetli hastalardan ve %40'ı akut lenfoblastik lösemi, safra kesesi kanseri, özafagus kanseri, prostat adenokarsinomu, non-hodgkin lenfoma gibi kanser hastalarından identifiye edilmiştir (12).

Ülkemizde ise sekiz hastanenin Yoğun Bakım Ünitelerinden (YBÜ) izole edilen gram-negatif bakterilerin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada, *P.aeruginosa* %24,6 oranı ile en sık izole edilen gram-negatif bakteri olarak bildirilmiştir (13). Son yıllarda *P.aeruginosa*'ların hastane enfeksiyonu olarak tespiti gittikçe artmaktadır (10). Hastane enfeksiyonlarından %8-25 oranında bu bakterinin sorumlu olduğunu gösteren değişik çalışmalar mevcuttur. Özellikle Yoğun bakım üniteleri ve nötropenik hastalar bu enfeksiyon etkeni açısından risk altındadır (14). Van bölgesinde 2011 yılında Karahocagil ve ark. yaptığı bir çalışmada yoğun bakımdan izole edilen enfeksiyon etkenleri arasında *Pseudomonas aeruginosa* %11,9 oranında saptanmıştır (15). Ahsen ve ark. 2012'de yaptığı bir araştırmada yoğun bakım ünitelerinde *Acinetobacter baumannii*'den sonra %20,9 ile *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonuna rastlanmıştır (16).

2.1.5. Patogenezi

P.aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezi bakterinin hem invazif hem de toksijenik mekanizması nedeniyle karmaşıktır. Enfeksiyonun bakterinin bağlanması ve kolonize olması, lokal invazyon, disseminasyon ve sistemik hastalık şeklinde aşamaları mevcuttur (3).

Bu süreçler piluslar, enzimler ve toksinlerle yürütülür. Mukozalara *Pseudomonas* kolonizasyonu pili ve fimbria aracılığı ile olur. Adezinlerde bağlanmayı kolaylaştırır. Sıklıkla kistik fibrozisli hastalardan izole edilen mukoid *P.aeruginosa* suşlarının polisakkarit kapsülü vardır. Bu kapsül alginat adı verilen tekrarlayan yapılar içerir. Bakterinin çevresindeki bu kapsül onu immun sistemden korumaktadır (3).

P.aeruginosa birçok hücre dışı enzim veya toksin salgılar. Elastaz ve alkalın proteaz virulansla en fazla ilişkili bulunan proteazlardır. Her ikisi de deri, akciğer ve korneada nekrotizan etki yapar. Elastaz kan damarlarındaki internal elastik laminayı yıkararak hemorajilere neden olur. Ayrıca hücreler arası bağlantıları parçalamaktadırlar(3).

P.aeruginosa iki hemolizin oluşturur. Birisi ısıya duyarlı fosfolipaz C, diğeri ise ısıya dayanıklı rhamnolipidtir. Her ikisi de sinerjistik etki ile lipidleri ve lesitini parçalar (3). *Pseudomonas* lipopolisakkariti, sistemik *Pseudomonas* enfeksiyonundaki ateş, hipotansiyon, oligüri, lökopeni veya lökositoz, dissemine intravasküler koagülasyon ve ARDS'de doğrudan rol oynar (8). Ekzotoksin A klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından oluşturulmaktadır. Memeli protein sentezini difteri toksinine benzer bir mekanizma ile inhibe etmektedir (3).

2.1.6. Virulans Faktörleri

P.aeruginosa pek çok virülans faktörüne sahiptir. Virulans faktörlerinin rolü ve önemi, doğal ve kazanılmış bağışık yanıt ve enfeksiyonun oluştuğı vücut bölgesi gibi bazı konak faktörleri tarafından etkilenir. Virulans faktörleri ile konak faktörleri arasındaki bu denge enfeksiyonun hafif veya ağır geçmesini belirleyen kriterdir (7).

2.2.6.1. Bakteriyel Faktörler

P.aeruginosa'nın virulans faktörleri arasında adezinler, pigment, ekzotoksin A, ekzoenzim S, hemolizinler, proteazlar ve alginat gösterilebilir. Bunlar bakterinin konağa yerleşmesine ve hastalık oluşturmaya katkıda bulunur (17).

2.2.6.1.1. Yüzey Adezinleri

P. aeruginosa'nın yüzeyinde pili ve nonpili hücre yüzey komponentleri olarak ayrılabilen iki tip protein adezini tanımlanmıştır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir (1).

2.2.6.1.2. Alginat

Bakteri yüzeyinde kapsülde yer alan mukoid ekzopolisakkarit yapısındaki alginat organizmayı, fagositozdan ve antibiyotik etkisinden korumaktadır. Bu etki nötrofillerin kemotaksisinin inhibisyonu, komplemanın alternatif yoldan aktive olması ve bakteriye karşı zayıf opsoninlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır (18). Bir polisakkarit olan alginat üretimini kontrol eden genler, mukoid *P.aeruginosa* kökenleri ile uzun dönem kolonize olan kistik fibrozisli veya diğerkronik solunum yolu hastalıkları olan hastalarda etkin olabilmektedir (9).

2.2.6.1.3. Pigment

P.aeruginosa'nın ürettiği mavi pigment olan piyosiyenin, oksijenin toksik formu olan hidrojen peroksit ve süperoksidin üretimini katalize eder. Bu pigment ayrıca nötrofil aktivasyonunun artmasına öncülük eden interlökin-8 salınımını uyarır. Sarı yeşil pigment olan piyoverdin demiri bağlayan bir siderofordur. Bu pigment ayrıca ekzotoksin A ve diğervirulans faktörlerinin de salınımını düzenler. Ayrıca piyorubin ve piyomelanin gibi pigmentleri bulunmaktadır (9).

2.2.6.1.4. Hemolizinler

P.aeruginosa iki çeşit hemolizin oluşturur. Bunlardan birisi ısıya duyarlı fosfolipaz C, diğeri ise ısıya dayanıklı rhamnolipittir. Bu iki madde sinerjistik olarak hareket ederek lipidleri ve lesitini hasara uğratar. Proteazlar gibi hemolizinler de nekroz yaparak, enfeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardımcı olur (1).

2.2.6.1.5. Ekzotoksin A

Enfeksiyon etkeni olarak saptanan çoğu *P. aeruginosa* ekzotoksin A sentezler. Bu toksin etkisini diğeri toksini gibi ADP-ribozil transferaz özelliği sayesinde elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) inhibe ederek hücre ölümüne yol açmak yolu ile gösterir. İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur (19).

2.2.6.1.6. Ekzoenzim S

Ekzoenzim S, Ekzotoksin A gibi bir adenosindifosfat ribozil transferazdır. Hedef proteini henüz tanımlanmamıştır. Saf ekzoenzim S, fareler için toksiktir. Doku kültürlerindeki hücrelere sitopatik etki gösterir. Ekzoenzim S salgılamayan suşlar deneysel yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlarında daha az virulandır (1).

2.2.6.1.7. Proteazlar

Elastini sinerjistik olarak indirgeyen iki enzim LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz), elastin içeren dokularda ve akciğer parankim dokusunda hasar ve yaygın hemorajik lezyonlarla ilişkilidir. Bu iki enzim kompleman bileşenlerini indirgeyerek nötrofil kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederek doku hasarı ve enfeksiyonun yayılımına neden olurlar (9).

Elastaza benzer şekilde alkalın proteaz da doku hasarı ve *P.aeruginosa* enfeksiyonunun yayılımına neden olur ve ayrıca konak bağışık yanıtına etkilidir (9).

2.2.6.1.8. Endotoksin

Pseudomonas endotoksini lipit A, diğer bakteriyel lipopolisakkaritler gibi organizmanın biyolojik etkisini düzenler (1). Lipopolisakkarit, ateş, şok, oligüri, lökositoz ve lökopeni, DIC ve ARDS gibi tablolarda rol oynar (8).

2.1.6.2. Konak Faktörleri

Enfeksiyon hastalığı gelişiminde kişinin immün yanıtı büyük önem taşımaktadır. Bütünlüğü bozulmamış deride enfeksiyon hastalığı meydana gelmezken, yara veya yanık bölgesi gibi hasarlı deride yerleşen bakteri bu bölgelerde çoğalarak kana geçebilir. Mukozal bariyer fonksiyonlarının kaybı *P.aeruginosa*'yı önemli bir patojen haline getirmektedir. Gözde korneal mukoza ve epitel yüzeyde meydana gelen fiziksel hasar bakteri için fırsat oluşturmaktadır. Doğal bağışıklık sisteminin bu önemli öğeleri kanser kemoterapisi, antibiyotik kullanımı, üst solunum yolunda endotrakeal tüp kullanımı gibi nedenler ile hasara uğrayabilir ve bu nedenle doğal bağışıklık sistemi görevini yerine getiremez (7).

Mukozal yüzeylerde ve kanda bulunan kompleman ve kollektinler gibi çözünür faktörler opsonizasyonun meydana gelmesini sağlayarak fagositozun etkisini arttırmaktadır. Bu çözünür faktörlerdeki çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilecek bozukluklar konağı bakteri karşısında zayıf duruma düşürür. Konak savunma mekanizmasında önemli etmenlerden olan IL-1, TNF-a, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-18, TGF-b ve nitrik oksit gibi sitokin, kemokin ve oksijen radikalleri, bir taraftan enfeksiyonun üstesinden gelmeye çalışırken diğer taraftan patojenin yoğunluğuna bağlı olarak enflamasyona yol açar ve doku hasarına neden olabilirler. Doğal olarak bağışıklık sisteminde önemli bir yer tutan mediyatörlerin daha az ortaya çıkmasına neden olan faktörler, enfeksiyonu kolaylaştırabildiği gibi daha az enflamasyona neden olarak enfeksiyonun kronikleşmesine de yol açabilir (7).

2.1.7. Oluşturduğu Enfeksiyonlar

P.aeruginosa, yüzeysel bir deri enfeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. Enfeksiyonları yüksek mortalite ile seyreder(18).

Endokardit: *P.aeruginosa* prostetik kalp kapaklarında ve ilaç bağımlılarında doğal kapakta yerleşerek endokardite neden olur. *Pseudomonas* endokarditli hastaların %90'ından fazlası ilaç bağımlısıdır. Triküspit kapak tutulumu daha sık olmakla beraber pulmoner, aortik veya mitral kapak ve her iki atriumun mural endokardiyumu da tutulabilir (3).

Solunum Sistemi Enfeksiyonları: Lokal respiratuar veya sistemik konak savunma sisteminde bozukluk olan kişilerde akut, hayatı tehdit edici pnömoniye neden olur. Kronik akciğer hastalığı veya konjestif kalp yetmezliği ya da her ikisi olan kişilerde hastane ortamı ile karşılaştıklarında özellikle yoğun bakımda yatan yapay solunum cihazları ve antibiyotik kullanımı sonrası görülür (3). Üst solunum yoluna kolonize olan *P.aeruginosa* ilerleyerek titreme, ateş, ağır dispne, produktif öksürük, pürülan balgam, siyanoz, mental konfüzyon ile fulminan gidişli çoğunlukla fatal seyreden pnömoniye neden olur (3).

P.aeruginosa'nın mukoid suşları kistik fibrozisli hastalarda bir yaştan altında %21, 26 yaştan üzerinde %80'e kadar oranla alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olabilir (3).

Bakteriyemi: *P.aeruginosa* bakteriyemisi, hastanede kazanılan primer Gram negatif bakteriyemiler içinde dördüncü sıklıktadır. Mortalite oranı değişiklik göstermekle birlikte kanserli hastalarda %33-38 oranındadır. Hastalık sırasında ektima gangrenozum adı verilen hemorajik ve nekrotik döküntüler görülür (1).

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları: Kulak, mastoid veya paranasal sinus gibi kaynaktan komşuluk yolu ile kafa travması, cerrahi, invazif tanısal girişimler ile subaraknoid aralığa veya beyine direkt inokülasyon ile veya bakteriyemi gibi yollarla *P.aeruginosa* menenjit veya beyin apselerine neden olabilir (3).

Kulak Enfeksiyonları: *P.aureginosa* normal kulakta nadiren bulunur. Fakat yaralanma, meserasyon, enflamasyon veya nem varsa eksternal auditor kanala sıklıkla yerleşir. Ağırlıklı olarak yaşlı ve diyabetik kişilerde, kısmen de damar hastalığı olan kişilerde malign eksternal otite neden olabilir (3).

Göz Enfeksiyonları: Penetran travma sonrası yabancı cisim batması veya kontamine göz damlaları ile konjonktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit gibi göz enfeksiyonları oluşturabilir ve görme kayıplarına bile sebep olabilir (2,3).

Kemik ve Eklem Enfeksiyonları: Hematojen enfeksiyonlar daha çok IV ilaç bağımlılarında üriner sistem veya pelvik enfeksiyonu takiben gelişir. Komşuluk yolu ile gelişen enfeksiyon ise penetran travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku enfeksiyonları sonrasında görülür (3).

Üriner Sistem Enfeksiyonları: *P.aeruginosa* ile üriner sistem enfeksiyonları çoğunlukla kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenli ve iyatrojeniktir (3).

Gastrointestinal Enfeksiyonlar: *P.aeruginosa* orofarinksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde enfeksiyon yapabilmesine karşın kliniğinin çok belirgin olmaması, diğer etkenlerin yol açtığı enfeksiyonlardan ayırt etmenin zorluğu nedeni ile gerçek sıklığının saptanması mümkün olamamaktadır. Yenidoğanlarda, hematolojik malignitesi olanlarda, kemoterapi gören nötropenik hastalarda enfeksiyonlara neden olurlar (3).

Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları: Yanık, travma, dekübitüs ülserleri veya dermatit ile bütünlüğü bozulmuş deride primer diffüz veya lokalize pseudomonas deri lezyonları meydana gelebilir (3).

2.1.8. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnç

P.aeruginosa vegetatif bakteriler içinde, çevre koşullarına en iyi uyum sağlayan bakteridir. Yeterli nem varlığında çok az besin maddesiyle canlılığını sürdürebilir. Hastanedeki solunum cihazları, duşlar, banyolar, soğuk su nemlendiricileri, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler, tamponlar gibi çok çeşitli yerlerden izole edilebilir. Dezenfektanlara dirençlidir. Dörtlü amonyum bileşikleri, heksaklorofenli sabunlar ve iyotlu solüsyonlar içinde üreyebilir. *Pseudomonas*'ların dezenfeksiyonunda fenoller ve beta gluteralehit etkili olabilir (1).

2.1.9. Laboratuvar Tanısı

Enfeksiyon tipine göre deri lezyonlarından sürüntü, püy, idrar, kan, BOS, balgam gibi klinik örnekler alınmalıdır. Gram boyalı preperatlarda, Gram negatif basiller görülür. Alınan örneklerin kültür ekimleri kanlı agara ve MacConkey agara yapılmalıdır. Kanlı agarda beta hemolitik koloniler, MacConkey agarda ise laktoz negatif koloniler görülür. Ekşi meyve kokusu duyulması ve üreme ortamını boyayan mavi yeşil pigmentin olması *Pseudomonas*'ı düşündüren tipik özelliklerdir (1).

MacConkey agarda üreme: Non fermentatif gram negatif bakteriler MacConkey agarda laktoz negatif koloniler oluşturarak ürerler. *P. aeruginosa* genellikle R koloniler oluşturmaktadır (20).

Hareket: Temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik konulur ve bakteri burada süspanse edilir. Üzerine lamel kapatılıp mikroskop altında incelenir ve bakterilerin hareketleri görülür. Karanlık alanda yapılan değerlendirmeler daha iyi sonuçlar vermektedir. Ayrıca asılı damla preperatı yöntemi ile hareket incelenebilir. Bunun için ortasında bir çukur bulunan lam kullanılır. Sıvı örnekten öze ile alınan örnek temiz bir lamel üzerine bırakılır. Lamel ters çevrilip örnek çukurlu lamın ortasına gelecek şekilde yerleştirilir. Bu şekilde örnek lam ile lamel arasında asılı olarak kalır. Mikroskop altında bakteri hareketleri incelenir (20).

Oksidaz deneyi: Deney için %95'lik etil alkol içerisinde 0,1 g alfa naftol eritilip birinci ayıraç ve 10 ml suda 0,1 g p-aminodimetilanilin oksalat eritilerek ikinci ayıraç hazırlanır. İncelenecek bakterinin yatık besiyerindeki 18-20 saatlik kültürlerinin üzerine bu iki ayıraçtan damlatılır. 30-60 saniye sonrasında koyu mavi renk oluşturması pozitif olarak değerlendirilir (20).

Oksidasyon – fermantasyon deneyleri: Non fermantatif bakterilerin bir kısmı glikozu okside ederler. Bu bakterilerden bazıları TSİ (triple sugar iron) besiyerinde yatık kısmı asitleştirirler. Diğer bir kısım bakteriler ise glikozu ne oksidasyon ne de fermantasyon yolu ile parçalarlar. TSİ besiyerinde renk değişikliği oluşturmazlar(20).

2.1.10. Antipseudomonal Antibiyotikler

P.aeruginosa enfeksiyonlarında çok sık direnç sorunu görülmesi nedeniyle antibiyotik kullanımı duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktam; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır (2,3).

Beta laktam antibiyotikler, kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktam, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş temel alt gruba ayrılırlar. Beta laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyellerin başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (4).

Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci önemli bir problemdir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında, karbapenemler dahil antipseudomonal antibiyotiklere direnç %40'lara ulaşmıştır. Beta laktamaz üretmeleri, eflüks pompaları ve düşük dış membran permeabiliteleri ile kombine direnç mekanizmalarına sahiptirler. Bunun sonucunda çoklu direnç paternleri ortaya çıkmaktadır (3).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'da İlaç Direnci

Seftazidim, siprofloksasin, gentamisin ve imipenemden en az üçüne dirençli *P.aeruginosa* kökenleri çoğul ilaca dirençli (multi drug resistant-MDR) *P.aeruginosa* olarak adlandırılır. Çoklu ilaç direnci özellikle hastane enfeksiyonlarında sorun oluşturmaktadır (21).

Son yıllarda *P. aeruginosa*' da saptanan kinolon direnci ve geniş spektrumlu beta laktam ajanlara karşı gelişen direnç nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmaktadır. Latin Amerika ülkelerini kapsayan 5 yıl süren çok merkezli bir çalışmada, karbapenemlerin de içinde bulunduğu antipseudomonal ajanlara karşı direncin yıllara göre artış gösterdiği ve %40'a ulaştığı belirlenmiştir(22).

P.aeruginosa pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik dirençlidir. Bu intrinsik direnç sebepleri arasında; ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması sayılabilir. Ayrıca *P.aeruginosa*'da beta laktamaz enzimlerinin varlığı antibiyotik direncinden sorumludur (5).

2.2.1. Atım Pompaları

P.aeruginosa'da beta laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmalarından biri atım pompalarıdır. Bu atım pompa sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama

sistemlerinin aşırı çalışmasına ve antimikrobiyallerin de dışarı atılmasına neden olurlar (23, 24).

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 (25). 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 oluşturması nedeniyle önemlidir. MexCD-OprJ aktif pompalama sistemi 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN aktif pompalama sistemi karbapenemlerde de direnç neden olabilir (24, 26, 27).

2.2.2. Dış Membran Geçirgenliği

Pek çok çözünür madde, bakteri hücresi içine porin adı verilen protein kanalları kullanarak girer. Porinlerden geçiş hızı, dış membran permeabilitesinin belirleyicisidir. *P. aeruginosa* dış membrane en az geçirgen olan patojenlerdendir ve bu nedenle antibiyotikli ortamlarda da varlığını sürdürme kapasiteleri yüksektir. Ayrıca uygun koşullarda bakteri, dış membran porinlerin ekspresyonunu azaltarak geçirgenliği daha da azaltabilir (28).

P. aeruginosa'da görülen ilaç direncinin bir nedeni de dış membran geçirgenliğinin azalmasıdır. Karbapenem direncinde, dış membranda bulunan OprD proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyon ile OprD proteinin eksprese olmaması, bu ajanların bakteri hücresine girişini kısıtlamaktadır (29).

OprD proteininin yokluğu, karbapenem grubu antibiyotikler içinde özellikle imipenem direncinin gelişmesinde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, OprD proteini olmayan izolatlarda, imipenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin meropeneme göre dört kat arttığı belirlenmiştir. Karbapenemlere karşı dirençte OprD kaybı önemli olmakla birlikte tek başına dirençte rol almadığı belirlenmiştir. Karbapenemlere karşı gelişen dirençte beta laktamaz enzimlerinin de son derece önemli bir rolü bulunmaktadır (30).

2.2.3. Beta Laktamazlar

Beta laktamazlar, beta laktam grubu antibiyotiklerde bulunan beta laktam halkasının amid bağlarına etki ederler ve bu bağları parçalarlar (6). Beta laktamazlar plazmit veya kromozomal kökenli bakteriyel enzimler olup bakteride beta laktamaz sentezi yapısal veya indüklenebilir düzeyde olabilir. Gram-negatif bakterilerde periplazmik alanda bulunan enzim, gram-pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır (7).

Beta laktamazlar, heterojen bir grup protein olmalarının yanı sıra bazı yapısal benzerlikler taşırlar ve sınıflandırılmalarında bu benzerliklerden yararlanılır. Genellikle sınıflandırmada iki yöntem ön plana çıkmaktadır. Ambler sınıflamasında; amino asit dizilerinin benzerliğine göre A, C ve D sınıfları serin beta laktamazlardan oluşurken, B sınıfı ise aktivite için çinko iyonuna gereksinim duyan metallo beta laktamazlardan oluşur (31). Enzimlerin substrat ve inhibitör profilleri gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri dikkate alınarak yapılan Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması 4 ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşmaktadır (32, 33).

Tablo I. Beta laktamazların sınıflandırılması (33)

Bush-Jacoby Grup	Mokelüler Sınıf	Substrat	İnhibisyon		Örnek enzimler
			Klavulanik asit	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	-	-	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Sefalosporinler	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penisilinler	+	-	PC1
2b	A	Penisilinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penisilinler	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	-	-	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, sefepim	+	-	RTG-4
2d	D	Kloksasilin	Değişken	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Değişken	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler	+	-	CepA
2f	A	Karbapenemler	Değişken	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Karbapenemler	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B	Karbapenemler	-	+	CphA, Sfh-1

2.2.3.1. Sınıf A Beta Laktamazlar

Aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunmaktadır. Birçoğu klavulanik asit ile inhibe olan ve genelde plazmit gibi hareketli genetik elementlerle kodlanan enzimlerdir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde en sık rastlanan A sınıfı beta laktamazlar, TEM-1 ile SHV-1'dir. Bu enzimler, temel olarak penisilinaz aktivitesine sahiptirler, sefalosporinlere karşı etkinlikleri çok azdır ve günümüzde birçok hastanede yaygın olarak rastlanan GSBL'lerin kökenleridir. GSBL'ler birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanı sıra oksiminino sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz eden, klavulanik asit ile inhibe olan beta laktamazlardır. TEM ve SHV türevi olmayan birçok A sınıfı beta laktamaz da bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER grubu (*PER-1* ve *PER-2*) enzimlerdir. Birçok TEM ve SHV türevi GSBL' nin aksine CTX-M grubu, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidimden daha iyi hidrolize eder ve ayrıca tazobaktam varlığında klavulanik asit ile olduğundan daha kolay inhibe olurlar (34).

Bunlara ek olarak Sınıf A içerisinde Bush grup 2f'de yer alan serin karbapenemazlarda bulunmaktadır. Bu karbapenemazları NMC/IMI, SME ve KPC olmak üzere 3 ana grup oluşturmaktadır. Bu enzimlerin hepsi karbapenemler, sefalosporinler, penisilinler ve aztreonamı hidrolize ederler ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. Bu gruba GES enzimleri dördüncü üye olarak sonradan eklenmiştir(35).

2.2.3.2. Sınıf B Beta Laktamazlar

B sınıfı beta laktamazlar, aktif bölgelerinde “serin” bulunan sınıf A, C ve D'den farklı olarak metallo enzimlerdir ve aktiviteleri için çinko veya diğer ağır metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok sefalosporine direnç geliştirirler. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmezler ancak EDTA ile inhibe olurlar. En sık saptanan metallo beta laktamazlar VIM, IMP, GIM ve SIM enzimleridir (36).

Bu sınıf beta laktamazların fenotipik olarak saptanmasında EDTA ile inhibisyon temeline dayanan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Metallo beta laktamazları tesbit etmek için en sık Modifiye Hodge testi, kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve MBL E test yöntemi kullanılmaktadır (37).

2.2.3.3. Sınıf C Beta Laktamazlar

C sınıfı beta laktamazlar, kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* spp. haricinde tüm gram-negatif basillerde bulunan beta laktamazlardır. C sınıfı beta laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri, penisilinlere oranla daha iyi hidroliz ederler ancak birçok C sınıfı enzim, beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez. AmpC tipi beta laktamaz genlerinin konjugatif plazmitler üzerinde de bulunabildiği gösterilmiştir (18).

2.2.3.4. Sınıf D Beta Laktamazlar

D sınıfı beta laktamazlar, serin proteazlar olup oksasilini hızla hidrolize edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidrolize edebilen (OXA) beta laktamazlara daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P. aeruginosa*'da rastlanmaktadır. OXA enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnç oluşturur, klavulanik asit ile çok az inhibe olurlar. Plazmit veya integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaları bakteriler arasında aktarıma katkıda bulunur. Bazı OXA tipi enzimler (OXA-2, OXA-10-11, OXA-14-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35) GSBL karakterindedir (18). Klinik önemi olan beta laktamazlar tablo II'de özetlenmiştir.

Tablo II. Klinik önemi olan β -laktamazlar (33)

Enzim ailesi	Fonksiyonel grup	Moleküler grup	Temsil eden enzimler
CMY	1, 1e	C	CMY-1 ile 50 arası
TEM	2b	A	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be		TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br		TEM-30, TEM-31, TEM-163
	2ber		TEM-50, TEM-158
SHV	2b	A	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be		SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br		SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	A	CTX-M-1, CTX-M-44 ile 92 arası
PER	2be	A	PER-1 ile 5 arası
VEB	2be	A	VEB-1 ile 7 arası
GES	2f	A	GES-2 ile 15 arası
KPC	2f	A	KPC-2 ile 10 arası
SME	2f	A	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d	D	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de		OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df		OXA-23, OXA-51, OXA-58
IMP	3a	B	IMP-1 ile 26 arası
VIM	3a	B	VIM-1 ile 23 arası
IND	3a	B	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 ile 7 arası

2.2.3.5. VIM

İlk VIM enzimi 1997 yılında İtalya’da bir *P.aeruginosa* suşunda bulunmuş ve kromozomal kaynaklı olduğu saptanmıştır. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan penisilinleri, sefalosporinleri, sefamisinleri, oksasefamisinleri ve karbapenemleri hidrolize eder fakat monobaktamlara etkisizdir (37, 38). VIM tipi enzimler *P.aeruginosa* izolatlarında sıklıkla Avrupa ve Güney Asya’da bulunmuşlardır. Ancak VIM-7 varyantı ABD’den de bildirilmiştir (39, 40).

VIM-tipi MBL’ler ilk olarak *P.aeruginosa*’da tanımlanmış olup daha sonra diğer non fermentatif gram negatif çomaklarda ve Enterobacteriaceae üyelerinde de saptanmıştır. Günümüze kadar 12 adet VIM varyantı saptanmış ve bunlar VIM-1, VIM-2 ve VIM-7 olmak üzere üç alt grupta toplanmışlardır. VIM-1 grubu; VIM-4,

VIM-5 ve VIM-11A'yı; VIM-2 grubu VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10 ve VIM-11B'yi kapsamaktadır. VIM-7 ise diğer VIM tiplerinden belirgin bir şekilde farklı olduğu için tek başına bir grup oluşturmaktadır. 2005 yılında Yunanistan'da cerrahi operasyon geçirmiş bir hastanın kan kültüründe üreyen bir *Klebsiella pneumoniae* suşundan izole edilen VIM-12 en son bulunan VIM-tipi enzimdir. VIM-12, VIM-1 ile %97 ve VIM-2 ile %93.6 aminoasit benzerliğine sahiptir (40, 41).

2.2.3.6. IMP

IMP İlk kez 1991 yılında Japonya'da izole edilen bir *Serratia marcescens* suşunda tespit edilmiştir. IMP-1 kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilmektedir. Penisilinlere, sefalosporinlere, sefamisinlere, oksasefamisinlere ve karbapenemleri hidrolize ederken monobaktamlara etki etmemektedir (37, 42).

IMP tipi enzimler Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa* ve diğer gram negatif nonfermentatif bakterilerden izole edilen ilk MBL'lerdir. IMP-1'in Uzak Doğu'nun diğer ülkelerinde, Avrupa'da, Kanada'da, ABD'de, Güney Amerika'da ve Kuzey Afrika'da da görülmesi bu enzimin geniş bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir. IMP-1'in bir varyantı olan IMP-2 İtalya'da bir *A.baumannii* suşundan izole edilmiş ve bu ilk Avrupa örneği olmuştur (38, 43, 44).

2.2.3.7. GES

İlk kez 1998 yılında Fransa'da bir çocuk hastadan izole edilen *K.pneumoniae* suşunda GES enzimi bulunmuştur (45). GES-1 ile TEM ve SHV kaynaklı GSBL'ler arasında sadece %30 aminoasit benzerliği mevcuttur. Fakat GES türevleri olan GES-1 ve GES-2, IBC-1 ve IBC-2 ile yapısal olarak çok benzerdir. IBC-2, GES-1 enziminden sadece bir, IBC-1'den ise iki aminoasit farklılığına sahiptir (36).

GES tipi enzimler klavulanik asitle inhibe olurlar (38). GES-1 serin GSBL enzimi olmakla birlikte, birçok GSBL'den farklı olarak aztreonama karşı hidrolitik aktiviteye sahip değildir. Sefoksitine afinitesi vardır ve özellikle seftazidimi hidrolize

eder (46). GES-2 de serin enzimdir fakat karbapenemazlar grubuna girer, çünkü meropeneme etki etmemekle birlikte, imipeneme karşı düşük düzeyli hidroliz özelliği bulunmaktadır (47). GES-1'in son varyantı olan GES-9 karbapenemleri hidrolize etmez ancak monobaktamlara karşı aktivitesi diğer GES-1 türevlerinden daha fazladır (48).

2.2.3.8. OXA

OXA grubu enzimler dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oluşmuş ve oksiminosefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimlerdir. OXA beta laktamaz ailesi genotipik özellikleri ortak olmasından çok fenotipik özellikleri birbirine benzeyen beta laktamazlar tarafından oluşturulmuş Sınıf D'ye ait bir gruptur. OXA enzimleri için oksasilin ve kloksasilin temel substratlardır. Ayrıca sefalotin gibi dar spektrumlu sefalosporinleri ve ampisilini de hidroliz edebilirler (34).

OXA-15 enzimi OXA-2'den diğerleri ise OXA-10'dan köken alır. OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine neden olurken OXA-17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır. Bu enzim genlerinin çoğu plazmit, transpozon veya integron kontrolündedir. OXA-18 doğrudan diğer OXA enzimlerinden oluşmamıştır, en yakın olduğu enzim %42 oranında homoloji gösteren OXA-12'dir. OXA-31 ise sefepime direnç oluşturup seftazidimi etkilememesi ile diğer enzimlerden farklı bir özellik taşımaktadır (49, 50)

2.2.3.9. PER

PER-1 enzimi *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* başta olmak üzere *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes faecalis* gibi farklı gram-negatif bakterilerde bulunabilir (51). Seftazidim, sefotaksim, sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonam gibi birçok beta laktam ajanı hidrolize eder. Ancak karbapenem ve sefamisinlere karşı etkisizdir ve klavulanik asit ile inhibe olur (52).

PER-1 enzimi 1993 yılında Nordmann ve ark. tarafından tanımlanmıştır. PER-1'in 154 kb'den daha büyük bir plazmit tarafından kodlandığı ve suşların çoğunun direnci aktarabildiği bildirilmiştir (52). Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada ise, geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Salmonella typhimurium* izolatlarında PER-1 enzimi bulunduğu belirtilmiştir (51).

2.2.3.10. KPC

İlk KPC enzimi 1996 yılında Kuzey Karolina'da *K.pneumoniae* izolatında saptanmıştır. KPC-1'in saptanmasından sonra bir aminoasit değişimi ile KPC-2 tespit edilmiştir. KPC-2 üreten *K.pneumoniae* 2004 yılında New York'ta salgınlara neden olmuştur. Sonrasında KPC enzimleri *K.pneumoniae*'dan başka *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerde de saptanmıştır. Plazmidlerle aktarılan KPC karbapenemaz enzimleri bütün β -laktam enzimlerini hidrolize ederler (35).

2.2.3.11. Direnç Genlerinin Moleküler Epidemiyolojisi

Sınıf A'da bulunan GES enzimi ilk defa 1998 yılında Fransa'da bir hastadan izole edilen *K.pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır. Sonrasında GES enzimi çoğunlukla *P.aeruginosa*'larda saptanmasına rağmen Enterobacteriaceae türlerinde de saptanabilmektedir. Karbapenem aktivitesine sahip GES enzimi üreten izolatlar çoğunlukla Avrupa, Güney Afrika ve Uzak Doğu'dan raporlanmıştır (53).

Sınıf A'daki bir diğer enzim olan KPC enzimi de bazı Enterobacteriaceae'lar ve *P.aeruginosa*'da saptanmıştır. New York'ta yapılan çalışmalarda KPC enziminin *K.pneumoniae*'larda artış gösterdiği bildirilmiştir. KPC enzimi daha çok Amerika, Fransa, Kolombiya, İskoçya gibi ülkelerde tespit edilmiştir (53).

Sınıf B'de yer alan bir metallo beta laktamaz olan IMP-1 ilk kez 1988 yılında Japonya'da *P.aeruginosa* suşunda saptanmıştır. Sonrasında Kore, Singapur ve

İngiltere’den raporlanan örnekler vardır (54). Yine bu sınıfta yer alan VIM ise ilk kez 1997 yılında İtalya’da bir *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiştir (54).

Sınıf D’de yer alan OXA-10 enzim grupları ilk olarak Türkiye’den *P.aeruginosa* suşlarında saptanmıştır. Çoğunlukla Türkiye ve Fransa’dan bildirimler mevcuttur (34). Beta laktamazların substrat profilleri tablo III’te verilmiştir.

Tablo III. Beta laktamazların substrat profili (54)

β - Laktamaz	Moleküler Sınıf	Tip	Substrat				İnhibisyon	
			Penisilinler	Sefalosporinler	Aztreonam	Karbapenemler	Klavulanik asit	EDTA
ESBL	A	PER-1, -2	+	+	+	-	+	-
		GES-1, -8, -9	+	+	+	-	+	-
	D	OXA-11, -14, -15, -16, -17, 19, -28, -32, -161	+	+	+	-	-	-
		OXA-18, -45	+	+	+	-	+	-
Karbapenemaz	A	GES-2, -5	+	+	+	+	+	-
		KPC-2, -5	+	+	+	+	+	-
	B	IMP-1, -2, -4, -6, -9, -10, -11, -13, -14, -15, -16, -18, -19, -20, -21, -22, -25	+	+	-	+	-	+
		VIM-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -20	+	+	-	+	-	+

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli kliniklerden izole edilen ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan 195 *Pseudomonas aeruginosa* çalışmaya dahil edilmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır. İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel ve otomatize sistemler kullanılmıştır.

3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

Araştırma kapsamında toplanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üretimi rutin kullanımda yer alan Kanlı agar (Oxoid, England) ve EMB agar (Oxoid, England) ile gerçekleştirilmiştir. Antibiyogram için Mueller Hinton (Oxoid, England) besiyeri kullanılmıştır. İdentifikasyonda Triple Sugar Iron Agar (BioMerieux, France) kullanılmıştır.

Kanlı Agar besiyeri

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden üretici firma talimatları doğrultusunda 40 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 50 ml koyun kanı eklenerek besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 ml besiyeri olacak şekilde dağıtılmıştır.

Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden üretici firma talimatları doğrultusunda 36 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 ml besiyeri olacak şekilde dağıtılmıştır.

Mueller-Hinton Agar

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden üretici firma talimatları doğrultusunda 38 g tartılıp, 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 ml besiyeri olacak şekilde dağıtılmıştır.

Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden üretici firma talimatları doğrultusunda 65 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Yaklaşık 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere tüpler yaklaşık 45° lik açı yapacak şekilde yerleştirilerek her tüpe 10-12 ml besiyeri dağıtılmıştır.

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri ve solüsyonlar saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda besiyeri ve solüsyonlar için otoklavda 121 °C’de 15 dakikada sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

Besiyerlerinin kontaminasyon kontrolü için, hazırlanan petrilere rastgele örneklem yöntemi ile %5 olacak şekilde 48 saat 37°C’lik etüvde inkübe edilmiştir. Sterillik denetlenmesinden sonra uygun bulunan besiyerleri izolasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları için kullanılmıştır.

3.3. Suşların İdentifikasyonu

Suşların identifikasyonu konvansiyonel yöntemlerle hareket, oksidaz aktivitesi, glikoz ve laktoza oksidatif ve fermentatif etki, karakteristik koku, mavi yeşil pigment oluşturma, gaz oluşturma ve hemoliz yapma gibi değerlendirme kriterlerine göre yapılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* olarak değerlendirilen suşlar otomatize sistem VITEC 2 (BioMerieux, France) ile identifiye edilmiştir. İdentifikasyon işlemleri tamamlanan bakteriler kriyobank saklama besiyerine (AES Chemunex Cryo-billes, France) ekilerek -80°C buzdolabında saklanmıştır.

Hareket testi; bakterilerin hareketliliklerinin araştırıldığı bir testtir. Çeşitli şekillerde (asılı damla, yarı katı besiyeri) yapılmaktadır. Temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik konulmuş ve bakteri burada süspanse edilmiştir. Üzerine lamel kapatılıp mikroskop altında incelenmiş ve bakterilerin hareketleri görülmüştür.

Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enzimine sahip olan bakterilerin tanımlanmasında kullanılan bir testtir. Besiyerinden oksidaz çubuğuyla (Oxoid, England) tek koloni alınıp 10 saniye içerisinde oksidaz çubuğunda mavi-siyah renk oluşması gözlenmiştir.

Şüpheli koloniler TSİ besiyerine ekilerek değerlendirme yapılmıştır. TSİ agara iğne öze yardımıyla alınan saf koloni, besiyerinin dik kısmına batırılarak, yatık kısmının yüzeyine de zikzaklar çizilerek ekim yapılmıştır. Sonuçlar 37°C’de bir gün inkübasyonda bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. TSİ besiyeri ile bakterilerin glikoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkileri ve H₂S oluşturup oluşturmadıkları saptanmıştır.

Bakterinin hemolitik aktivitesinin varlığının tespiti için kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan hemoliz zonu gözlenmiştir. Eritrositlerin parçalanması hemolizin enzimi ile olur. Bu test esas itibarı ile bakterinin hemolizin yapıp yapmadığının tespitidir. *P. aeruginosa* kanlı agarda beta hemoliz oluşturur.

3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon ve E test yöntemleri kullanılmıştır.

3.4.1. Disk Difüzyon

Disk difüzyon yönteminde antibiyotik emdirilmiş pamuklu diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve

bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanların çapı ölçülerek “duyarlı”, “orta duyarlı” ve dirençli” olarak duyarlılık kategorileri belirlenir (55).

İncelenecek izolatların Mueller Hinton Agara (MHA)’a ekimleri yapılmış ve 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik taze kültürlerden 0,5 McFarland bulanıklık sağlayacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon steril eküvyon çubuk ile MHA yüzeyine homojen olacak şekilde yayılmış ve besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Sonuçlar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak ATCC *P.aeruginosa* 27583 kullanılmıştır (56).

Duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile incelenen antibiyotikler (Oxoid, England) seftazidim (30 µg), gentamisin (10 µg) , tobramisin (10 µg), piperasilin (100 µg), amikasin (30 µg), aztroenam (30 µg), sefepim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tazobaktam-piperasilin (110 µg) ve ofloksasin (5 µg)’dir (56).

3.4.2. E Test

E test difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, inhibisyon alanının stribi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (55).

Çalışmaya alınan izolatların İmipenem ve Seftazidim duyarlılığı E-Test (Liofilchem, Italy) yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre araştırılmıştır. Bu amaçla, suşların saf kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklık sağlayacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon steril eküvyon ile MHA yüzeyine homojen olacak şekilde yayılmış, E Test stripleri

birbirine paralel olacak şekilde besiyeri yüzeyine yerleştirilmiş ve 24 saat 37°C’de inkübasyon sonrası MİK değerleri belirlenmiştir. MİK sınır değeri seftazidim için ≤ 8 duyarlı, 16 orta duyarlı, ≥ 32 dirençli, imipenem için ≤ 2 duyarlı, 4 orta duyarlı, ≥ 8 dirençli olarak raporlanmıştır (56).

3.5. İndüklenebilir Beta Laktamaz Varlığının Saptanması (Çift Disk İndüksiyon)

İndüklenebilir beta laktamazları saptamak için MHA yüzeyine 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edildikten sonra beta laktamaz indükleyicisi olarak imipenem diski ve 20 mm uzaklığına seftazidim diski yerleştirilmiştir. Seftazidimin indükleyici olan imipeneme bakan yüzünde inhibisyon zonunun belirgin olarak daralması İBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir.

3.6. GSBL Çift Disk Sinerji Testi

İncelenecek izolatların 24 saatlik taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA plağına yayılmış petrinin ortasına amoksisilin/klavulanik asit (20/10µg), etrafına disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftazidim (30µg), sefotaksim (30µg), sefepim (30µg) antibiyotik diskleri steril bir şekilde yerleştirilmiştir ve 37 °C’de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Sefalosporin veya aztreonam arasındaki inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanik asit diskine doğru genişlemesi veya diğer antibiyotik diskleri arasında bakterin üremediği bir sinerji alanı oluşturması GSBL pozitif kabul edilmiştir.

3.7. Metallo Beta Laktamazların Fenotipik Olarak Saptanması

Çalışmada kullandığımız MBL-E-test (Liofilchem, Italy) ticari olarak bulunan ve metallo beta laktamaz enziminin fenotipik tayininde kullanılmak üzere geliştirilen bir

testtir. E-test şeritinin bir tarafında giderek azalan konsantrasyonda imipenem (256 µg/ml - 4 µg/ml), diğer tarafında ise imipenemle birlikte EDTA bulunmaktadır (64 µg/ml-1 µg/ml). İmipenem + EDTA kısmında imipenem konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu (4 µg/ml) sabittir. İmipenem+EDTA MİK değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az sekiz kat azalma saptanırsa, test metallo beta laktamaz enzimi açısından pozitif kabul edilmektedir. Testin pozitif olmasının diğer bir kriteri, E-test şeritinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde “ghost zone” (hayalet bölge) olarak adlandırılan görüntünün izlenmesidir (57).

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarına uygulanan E-test yönteminde, bakteri izolatlarının taze kültürlerinden 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril bir eküvyonla MHA üzerine bakterinin homojen inokülasyonu yapılmıştır. Besiyeri yüzeyinin kurumasının ardından E-test şeridi besiyeri üzerine yerleştirilmiş ve plaklar 35°C’da 24 saat inkübe edilmiştir.

3.8. Direnç Enzimlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanması

Öncelikle elde edilen izolatların DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ardından iki aşamalı olarak moleküler çalışmalara geçilmiştir. Birinci aşamada inhouse PZR ile optimizasyon çalışmaları ikinci aşamada ise Real Time PZR yapılmıştır.

3.8.1. Kalıp DNA Hazırlanması

Her bakteri suşu için, steril eppendorf tüplere 100µL lizis tamponu koyularak, steril öze ile her petriden 2-3 koloni alınıp lizis tamponu içerisinde iyice çözünmesi sağlanmıştır. Kaynamış 100°C’lik saf suda 15 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında soğuması için beklenmiş ve tüpler soğuyunca santrifüjde 14000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantın 30µL’si alınıp PZR işlemi için ayrılmıştır.

3.8.2. Primerlerin Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan primerler (Biomers, Germany) liyofilize halde bulunmaktadır. Sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda protokole uygun olarak yapılmış ve 100 pmol/μl konsantrasyonda stok primerler elde edilmiştir. Çalışmamızda primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/μl olması gerektiği için 100 pmol'den 10 μl + 90 μl distile su olacak şekilde tekrar sulandırılmış, ependorflara ayrılıp -20°C'de saklanmıştır.

3.8.3. PZR Optimizasyonu

PZR çalışmalarında kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için inhouse PZR ile farklı sıcaklıklarda optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Primerlerin bağlanma ısıları $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü ile hesaplanmış. Çalışmada PER, OXA, IMP, VIM, KPC ve GES gen bölgelerinin gösterilmesi için 6 ayrı primer seti kullanılmıştır. İnhouse PZR ile optimizasyonları yapılan gen bölgelerinin moleküler çalışması Real Time PZR ile yapılmış ve pozitif bulunan örnekler agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. Çalışmada kullanılan PZR reaksiyon karışımı Tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV. PZR reaksiyon karışımı

CYBR (marka)	12,5μl
Primer Forward	1 μl
Primer Reverse	1 μl
DNase Free Water	9,5 μl
DNA	1 μl
Toplam	25 μl

3.8.4. İzolatların Moleküler Olarak Doğrulanması

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının moleküler olarak tanımlanması için 23S RNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bunun için F 5' CGG AGG AGG CTA GGG CCG 3' ve R 5' GAC CGC CCC AGT CAA ACT GCC 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon

işlemi gerçekleştirilmiştir ve 831 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo V’te verilmiştir.

Tablo V. 23S RNA gen bölgesi PZR protokolü

95°C	7 dakika	1 siklus
95°C	30 saniye	35 siklus
58°C	30 saniye	
72°C	20 saniye	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.8.5. PZR ile OXA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında OXA gen bölgesinin belirlenmesi için OXA-A 5’ TAT CGC GTG TCT TTC GAG TA 3’ ve B 5’ TTA GCC ACC AAT GAT GCC C 3’ primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 775 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo VI’da verilmiştir.

Tablo VI. OXA gen bölgesi PZR protokolü

95°C	5 dakika	1 siklus
95°C	1 dakika	35 siklus
56°C	1 dakika	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.8.6. PZR ile PER Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında seftazidim direncine sebep olan *PER-1* geninin belirlenmesi için PER-A 5’ ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC 3’ ve PER-D 5’ AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA 3’ primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 925 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo VII’de verilmiştir.

Tablo VII. PER gen bölgesi PZR protokolü

95°C	10 dakika	1 siklus
95°C	30 saniye	35 siklus
53°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	5 dakika	1 siklus

3.8.7. PZR ile GES Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında GES gen bölgesinin belirlenmesi için F 5' GTT TTG CAA TGT GCT CAA CG 3' ve R 5' TGC CAT AGC AAT AGG CGT AG 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 371 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo VIII'de verilmiştir.

Tablo VIII. GES gen bölgesi PZR protokolü

95°C	5 dakika	1 siklus
95°C	1 dakika	35 siklus
56°C	1 dakika	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.8.8. PZR ile VIM ve IMP Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında karbapenem direncinden sorumlu metallo beta laktamaz enzimi olan VIM gen bölgesinin belirlenmesi için VIM F 5' GTG TTT GGT CGC ATA TCG C 3' ve R 5' CGC AGC ACC AGG ATA GAA G 3' primerleri kullanılmış, IMP gen bölgesinin belirlenmesi için ise 5' GAA TAG AGT GGC TTA ATT CTC 3' ve R 5' CCA AAC CAC TAC GTT ATC 3' primerleri kullanılmıştır. PZR sonucu VIM için 380 bp, IMP için 188 bp büyüklüğünde ürünleri elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo IX'da verilmiştir.

Tablo IX. VIM ve IMP gen bölgesi PZR protokolü

95°C	5 dakika	1 siklus
95°C	1 dakika	35 siklus
53°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.8.9. PZR ile KPC Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında KPC gen bölgesinin belirlenmesi için F 5' CGC CGT GCA ATA CAG TGA TA 3' ve R 5' CGT TGA CGC CCA ATC C 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 503 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo X'da verilmiştir.

Tablo X. KPC gen bölgesi PZR protokolü

95°C	5 dakika	1 siklus
95°C	1 dakika	35 siklus
55°C	1 dakika	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.8.10. Agaroz Jel Elektroforez

PZR sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezde incelenmiştir. Bunun için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. % 2'lik jel yapmak için 1g agaroz tartılıp 50mL 1X TBE içerisinde çözülerek mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Biraz soğuması beklendikten sonra içerisine 2.5 µL Etidyum Bromür ilave edilip, jel içerisinde iyice karışması sağlanmıştır.

Bu sırada jel dökme tablasının kenarları otoklav bandı ile bantlanmış ve oda sıcaklığına kadar soğutulan jel yavaşça bir kenarından tablaya dökülmüştür. Tarak

düzgün şekilde jel tablasının içerisine yerleştirilip, jel oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

Katılaştıran jel içerisinden tarak çıkarılmış ve jel, içerisine 250 mL 1X TBE tampon konulan elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiştir. 10 µl PZR ürününe 2 µl yükleme solüsyonu eklenip jele yüklenmiştir. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanmış ve 100 Volt şiddetinde akım 1 saat boyunca uygulanmıştır. PZR sonucu oluşan ürünler, marker ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Oluşturulan bantlar jel görüntüleme sisteminde analiz edilmiştir.

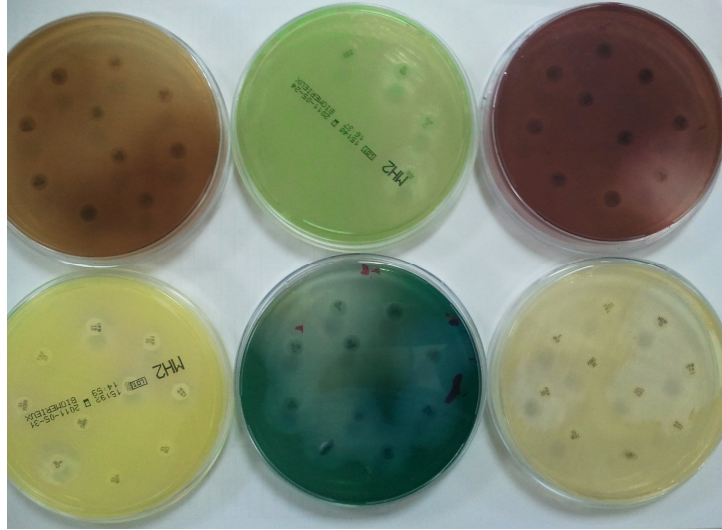
3.9. Dizi Analizi

PZR reaksiyonları sonucu oluşan ampikonların dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla ampikonlar Macrogen (Netherlands) firmasına gönderilmiş ve sekans dizileri elde edilmiştir. Sekans dizileri NCBI Blast programı kullanılarak veri bankasıyla karşılaştırılmış, ampikonların hangi genle homolog olduğu belirlenmiş ve böylece çoğaltılan ampikonlar doğrulanmıştır.

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)

4. BULGULAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2010 ve 2012 yılları arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden konvansiyonel identifikasyon yöntemleri dahilinde kanlı agarda beta hemoliz, genellikle R koloni yapan, Mueller-Hinton agarda mavi yeşil pigment oluşturan, oksidaz pozitif koloniler gram boyama sonucunda Gram negatif bakteriler *Pseudomonas aeruginosa* olarak değerlendirilip otomatize sistem VITEC 2 ile identifikasyonları yapılmıştır. Bu yöntemle toplam 195 *P.aeruginosa* çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Örneklerin 134'ü erkek 61'i kadın hastadan alınmıştır.

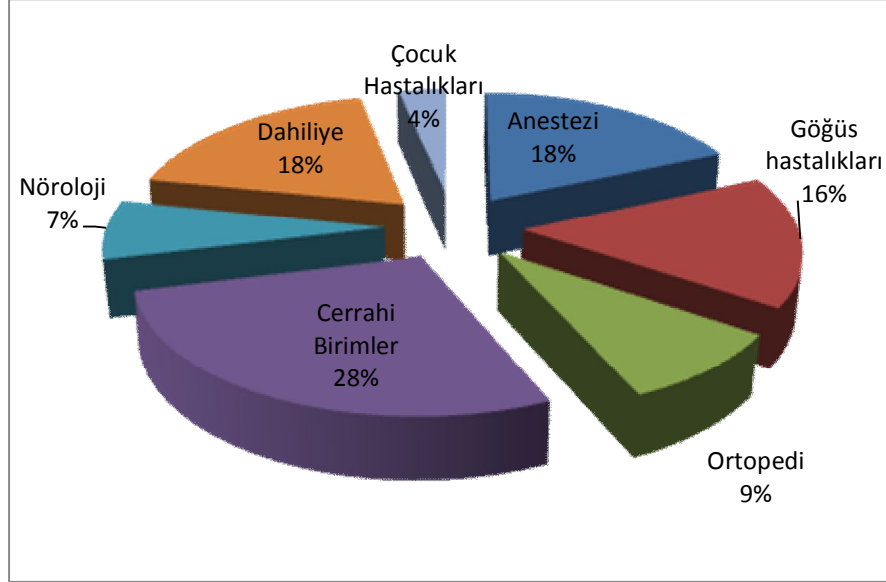


Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* MHA'da pigment görünümü

***Pseudomonas aeruginosa* Suşların İzole Edildikleri Örnek Türleri ve Klinik Servisler**

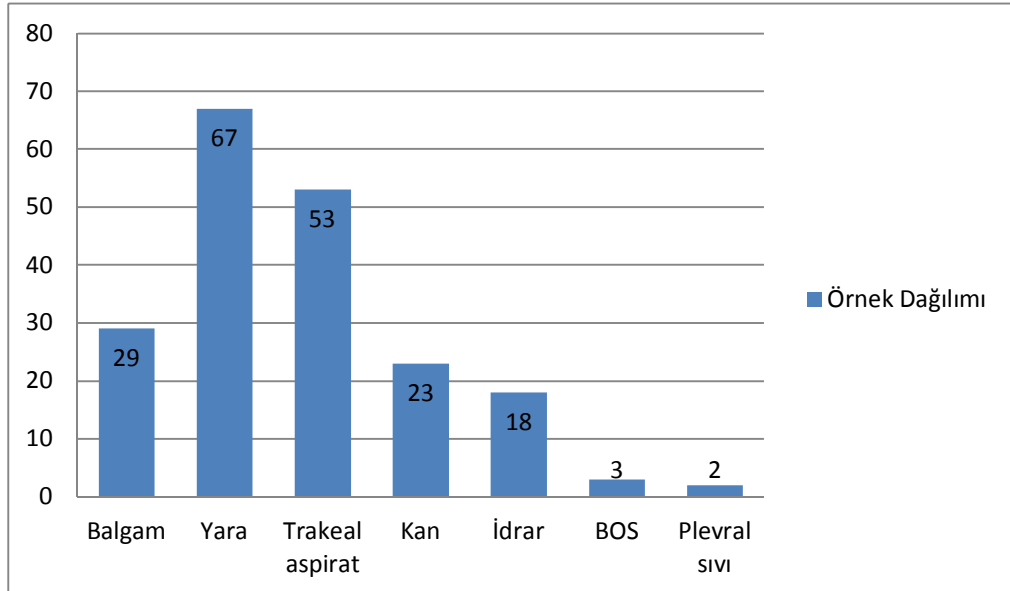
Çalışmaya alınan 195 *P.aeruginosa* izolatının 33'ü Anestezi yoğun bakım, 29'u Göğüs hastalıkları, 16'sı Ortopedi, 50'si Cerrahi birimler (Genel Cerrahi, Beyin Cerrahisi, Plastik Cerrahi), 13'ü nöroloji, 33'ü Dahiliye, 15'i Enfeksiyon hastalıkları ve 6'sı Çocuk hastalıkları servislerinden izole edilmiştir.

Tablo XI. Örneklerin klinik dağılımı



Çalışılan örneklerin 29'u balgam, 67'si yara, 53'ü trakeal aspirat, 23'ü kan, 18'i idrar, 3'ü beyin omirilik sıvısı ve 2'si plevral sıvı olarak saptanmıştır.

Tablo XII. Şuşların örnek dağılımı



Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

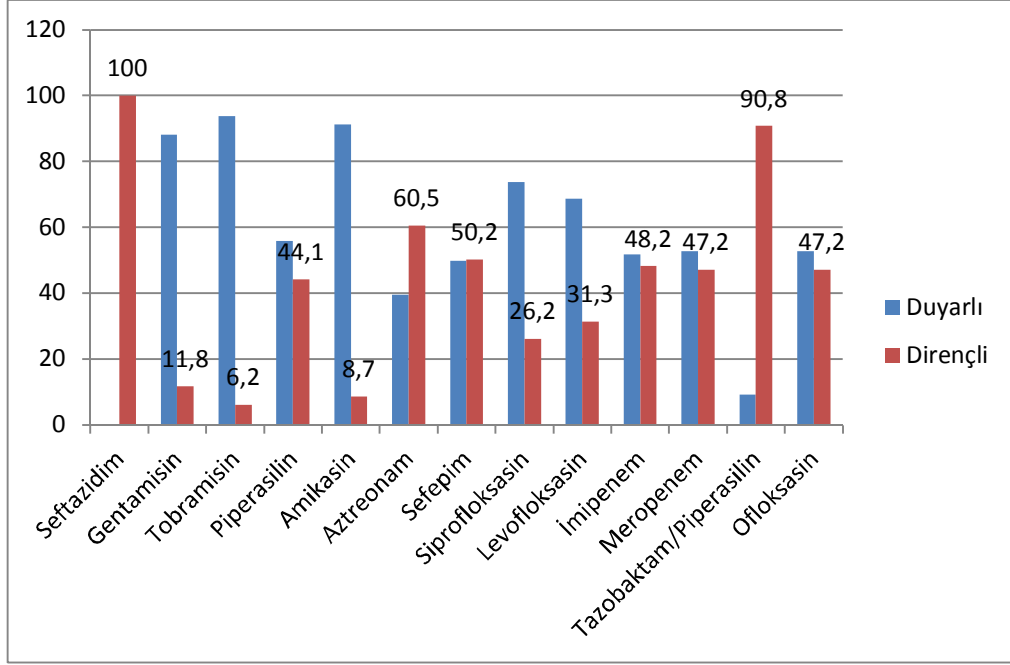
Çalışmaya alınan 195 *P.aeruginosa* izolatına ait antibiyotik duyarlılık testleri, CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon ve E test yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre seftazidime %100, gentamisine %11,8, tobramisine %6,2, piperasilin %44,1, amikasin %8,7, aztroenama %60,5, sefepime %50,2, siprofloksasine %26,2, levofloksasine %31,3, imipenem %48,2, meropenem %47,2, tazobaktam-piperasiline %90,8 ve ofloksasine %47,2 oranlarında direnç tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 195 *P.aeruginosa* izolatının 49'u (%25,1) çoklu ilaç direncine sahip olarak tanımlanmıştır.

Yapılan E test sonuçlarına göre imipenem MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değeri 4 µg/ml ve üzerinde olan 95 suş, seftazidim MİK değeri 16 µg/ml ve üzerinde olan 105 suş saptanmıştır (Tablo XIII).

Tablo XIII. Seftazidim ve imipenem MİK dağılımları

MİK (µg/ml)	Seftazidim		İmipenem	
	N	%	n	%
0,10	-	-	1	0,5
0,19	2	1,0	2	1,0
0,38	4	2,0	4	2,0
0,50	7	3,6	7	3,6
0,75	3	1,5	10	5,2
1,0	15	7,8	28	14,4
1,5	23	11,8	27	13,9
2	16	8,2	14	7,2
3	9	4,6	2	1,0
4	3	1,5	6	3,1
6	1	0,5	2	1,0
8	4	2,0	4	2,0
12	1	0,5	4	2,0
16	15	7,8	3	1,5
24	7	3,6	13	6,7
32	30	15,4	59	30,3
48	13	6,7	3	1,5
64	24	12,3	5	2,6
96	1	0,5	1	0,5
128	4	2,0	-	-
192	5	2,6	-	-
256	8	4,1	-	-
Toplam	195	100	195	100

Tablo XIV. Antibiyotik duyarlılık ve direnç oranları

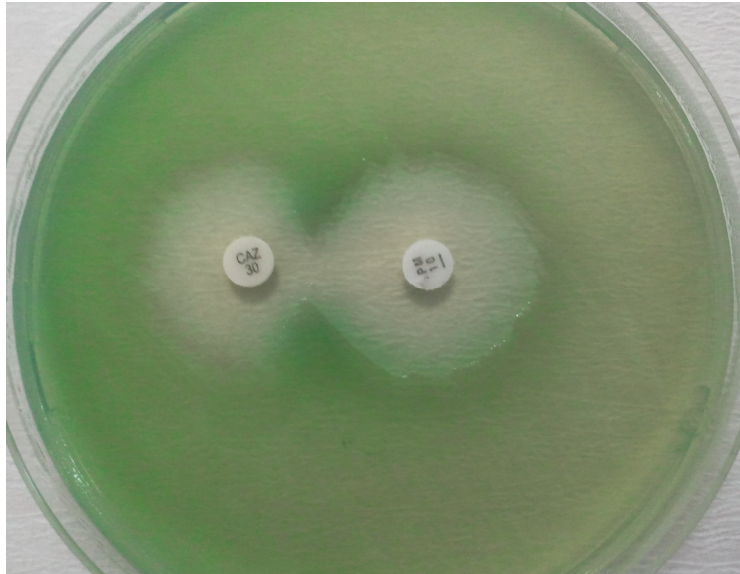


Tablo XV. Antibiyotik direncini yıllara göre dağılımı

	2010 % (n:30)	2011 % (n:77)	2012 % (n:88)	Toplam % (n:195)
Seftazidim	100 (30)	100 (77)	100 (88)	100 (195)
Gentamisin	3,3 (1)	10,4 (8)	15,9 (14)	11,8 (23)
Torbamisin	3,3 (1)	2,6 (2)	10,2 (9)	6,2 (12)
Piperasilin	43,3 (13)	36,4 (28)	51,1 (45)	44,1 (86)
Amikasin	6,7 (2)	11,7 (9)	6,8 (6)	8,7 (17)
Aztreonam	56,7 (17)	51,9 (40)	69,3 (61)	60,5 (118)
Sefepim	46,7 (14)	49,5 (38)	52,3 (46)	50,2 (98)
Siprofloksasin	10 (3)	16,9 (13)	39,8 (35)	26,2 (51)
Levofloksasin	16,7 (5)	22,1 (17)	44,3 (39)	31,3 (61)
İmipenem	40 (12)	32,5 (25)	64,8 (57)	48,2 (94)
Meropenem	46,7 (14)	33,8 (26)	59,1 (52)	47,2 (92)
Tazobaktam/piperasilin	100 (30)	83,1 (64)	94,3 (83)	90,8 (177)
Ofloksasin	36,6 (11)	27,3 (21)	68,2 (60)	47,2 (92)

Bakteri ekimi yapılmış petrinin ortasına amoksisilin/klavulanik asit (20/10µg), etrafına disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftazidim (30µg), sefotaksim (30µg), sefepim (30µg) antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Sefalosporin veya aztreonam arasındaki inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanik asit diskine doğru genişlemesi veya diğer antibiyotik diskleri arasında bakterin üremediği bir sinerji alanı oluşturması GSBL pozitif kabul edilmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ile taranan 195 örneğin 60'ında GSBL pozitifliği saptanmıştır.

İndüklenebilir beta laktamazları saptamak için imipenem diski ve 20 mm uzaklığına seftazidim diski yerleştirilmiştir. Seftazidimin indükleyici olan imipeneme bakan yüzünde inhibisyon zonunun belirgin olarak daralması İBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Çift disk indüksiyon yöntemi ile 195 suştan 174'inde (%89,2) indüklenebilir beta laktamaz tespit edilmiştir.

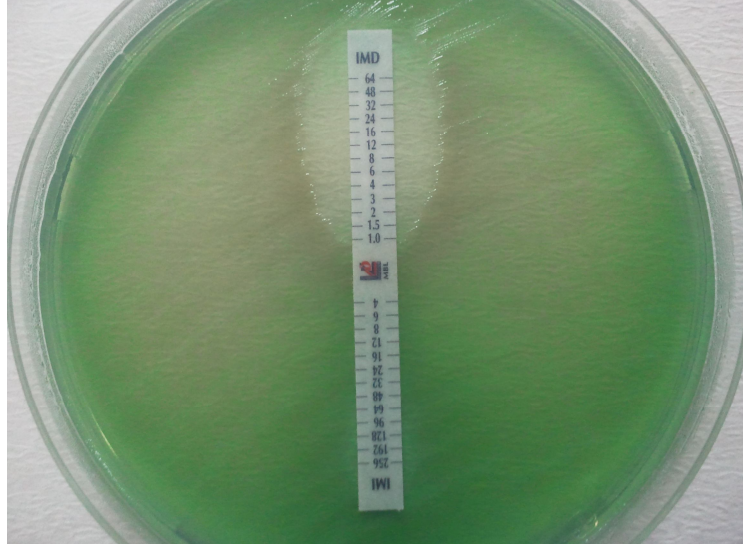


Şekil 2. MHA'da çift disk indüksiyon yöntemi

MBL E Test Sonuçları

MBL E test yöntemi ile İmipenem+EDTA MİK değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az sekiz kat azalma saptanması ve E-test şeritinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde “ghost zone” (hayalet bölge) olarak adlandırılan

görüntünün izlenmesi MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna E test yöntemi ile 52 suşta metallo beta laktamaz enzimi fenotipik olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. MBL E Test

PER Enziminin Genotipik Yöntemlerle Gösterilmesi

P. aeruginosa suşlarında PER-1 enzimi kodlayan gen varlığı PER-1A ve PER-1D primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hiçbir suşta PER geni saptanmamıştır.

OXA Enziminin Genotipik Yöntemlerle Gösterilmesi

P. aeruginosa suşlarında OXA-A ve OXA-B primerleri ile gerçekleştirilen PZR ile OXA grubu enzim varlığı araştırılmıştır. Dokuz suşta, 775 bp'lik OXA gen bölgesinin varlığı belirlenmiş ve bant görüntüleri gösterilmiştir. *P. aeruginosa* suşları arasında OXA grubu enzim üretenlerin oranı % 4,6 olarak bulunmuştur.

GES Enziminin Genotipik Yöntemlerle Gösterilmesi

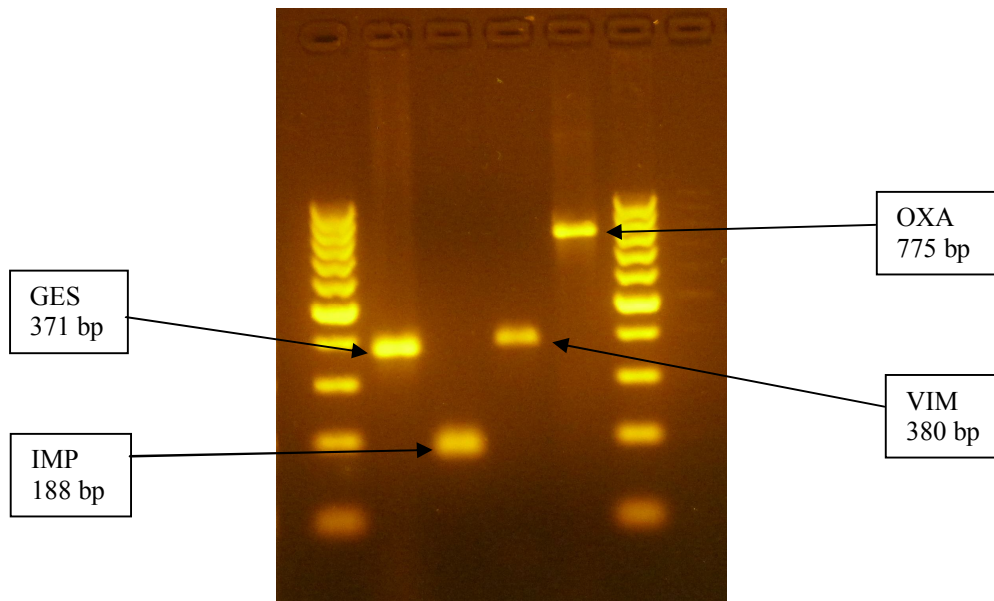
P. aeruginosa suşlarında GES-1 primeri ile gerçekleştirilen PZR ile GES grubu enzim varlığı araştırılmıştır ve 113 suşta, 371 bp'lik GES gen bölgesinin varlığı belirlenmiş ve jel elektroforezle bant görüntüleri gösterilmiştir. *P. aeruginosa* suşları arasında GES grubu enzim üretenlerin oranı % 57,9 olarak bulunmuştur.

KPC Enziminin Genotipik Yöntemlerle Gösterilmesi

P. aeruginosa suşlarında KPC enzimi varlığı KPC primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hiçbir suşta KPC geni saptanmamıştır.

VIM ve IMP Metallo Beta Laktamaz Enziminin Genotipik Yöntemlerle Gösterilmesi

P. aeruginosa suşlarında VIM ve IMP primerleri ile gerçekleştirilen PZR ile bu enzimlerin varlığı araştırılmıştır ve 195 suşun 4'ünde VIM, 2'sinde IMP gen bölgesinin varlığı real time PZR ile belirlenmiştir. VIM gen bölgesi için 380 bp, IMP gen bölgesi için ise 188 bp büyüklüğünde elde edilen ürünler jel elektroforezle görüntülenmiştir.



Şekil 4. Direnç genlerinin jel elektroforez görünümü

Direnç Genlerinin Alt Türlerinin Belirlenmesi

PZR sonucu direnç enzimlerini taşıdıkları belirlenen örnekler dizi analizine tabi tutulmuştur. VIM direnç geni taşıyan 4 örneğin de VIM-2 gen bölgesine sahip olduğu saptanmıştır. IMP gen bölgesi içeren izolatlar IMP-1 olarak tespit edilmiştir.

Query	Download		
Name	130429-65_A19_PSEUDOMONAS_G01_VIM	Length	1454
Start	28	End	351
Subject			
DB	emb	AC	CBX26623.1
Ref.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/313660954?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=0		
Gene	metallo-beta-lactamase VIM-2 [Pseudomonas aeruginosa]		
Start	4	End	111
Score			
Bit	211	Raw	536
EValue	4e-63		
Identities			
Match	106	Total	108
Pct.(%)	98		
Positives			
Match	106	Total	108
Pct.(%)	98		

Şekil 5. VIM geni dizi analizi sonuçları

OXA geni saptanan 9 örneğin 5'i OXA-10, 4'ü ise OXA-14 olarak tanımlanmıştır.

Query	Download		
Name	130429-65_I21_PSEUDOMONAS_H01_OXA	Length	776
Start	271	End	329
Subject			
DB	pdb	AC	1K56[C]
Ref.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/16974864?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=0		
Gene	Chain C, Oxa 10 Class D Beta-Lactamase At Ph 6.5		
Start	80	End	99
Score			
Bit	231	Raw	589
EValue	3e-72		
Identities			
Match	115	Total	153
Pct.(%)	75		
Positives			
Match	128	Total	153
Pct.(%)	84		

Şekil 6. OXA geni dizi analizi sonuçları

GES primerleri kullanılarak direnç genleri saptanan 113 izolatın 26'sı GES-1 olarak tespit edilmiştir. Diğer 87 izolatta aynı primerle saptanabilen ve dizi analizi sonucu ayrımı yapılabilen ABC transporter permease gen bölgesi tanımlanmıştır.

Query	Download		
Name	130429-65_E01_PSEUDOMONAS_A03_GES	Length	1000
Start	220	End	351
Subject			
DB	gb	AC	AED99300.1
Ref.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/332002539?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=0		
Gene	class A extended-spectrum beta-lactamase GES-1 [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>]		
Start	128	End	171
Score			
Bit	90.1	Raw	222
EValue	5e-18		
Identities			
Match	41	Total	44
Pct.(%)	93		
Positives			
Match	44	Total	44
Pct.(%)	100		

Şekil 7. GES geni dizi analizi sonuçları

Query	Download		
Name	130429-65_C01_PSEUDOMONAS_A02_GES	Length	1000
Start	214	End	330
Subject			
DB	dbj	AC	AB591379.1
Ref.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/307777741?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0		
Gene	Pseudomonas aeruginosa gene for ABC transporter permease, partial cds, clone: G-1		
Start	229	End	344
Score			
Bit	187	Raw	101
EValue	1e-43		
Identities			
Match	112	Total	117
Pct.(%)	96		

Şekil 8. ABC transporter permease geni dizi analizi sonuçları

PZR Yöntemi ile OXA Geni Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri

PZR ile OXA geni taşıdığı tespit edilen 9 örneğin tamamının seftazidim MİK değeri 16 µg/ml ve üzerinde olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç OXA enzimini taşıyan suşların seftazidime yüksek düzeyde direnç geliştirdiğinin göstermektedir.

PZR Yöntemi ile VIM ve IMP Geni Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri

PZR ile VIM ve IMP geni taşıdığı tespit edilen 6 örneğin tamamının imipenem MİK değeri 8 µg/ml ve üzerinde olarak saptanmıştır. Ayrıca bu suşların tamamının E test ile fenotipik olarak metallo beta laktamaz ürettiği saptanmıştır. Bu sonuç VIM ve IMP enzimini taşıyan suşların imipeneme yüksek düzeyde direnç geliştirdiğinin göstergesidir.

PZR Yöntemi ile GES Geni Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri

PZR ile GES geni taşıdığı tespit edilen 113 örneğin 83'ünün seftazidim MİK değeri 16 µg/ml ve üzerinde olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç GES enzimini taşıyan suşların çoğunun seftazidime yüksek düzeyde direnç geliştirdiğinin göstermektedir. Sekans analizi sonucu GES-1 enzimi taşıdığı saptanan 26 izolatın tümünün seftazidim MİK değerleri 16 µg/ml ve üzerinde olduğu saptanmıştır.

Şekil XVI. İzolatların örnek türü, klinik, fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemlere göre dağılımları

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
1	Göğüs	Blg	16	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ortop.	Yara	1,5	0,38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Dahiliye	T.A.	32	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	Nöro.	T.A.	64	32	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
5	Ortop.	Yara	8	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Cerrahi	Yara	0,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Dahiliye	Blg	1,5	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Ortop.	Yara	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
9	Anes.	Kan	32	0,19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	Cerrahi	Yara	48	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Anes.	T.A.	32	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Anes.	T.A.	1	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Enf.	Yara	32	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	Dahiliye	Plevra	3	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Göğüs	T.A.	1,5	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
16	Ortop.	Yara	1	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
17	Cerrahi	Yara	0,5	0,38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
18	Anes.	Kan	48	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
19	Göğüs	T.A.	32	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
20	Dahiliye	İdrar	1,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
21	Dahiliye	Yara	32	4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	Dahiliye	Yara	32	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
23	Anes.	T.A.	0,75	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Anes.	Blg	64	0,75	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	Anes.	T.A.	64	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Anes.	İdrar	64	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
27	Ortop.	Yara	0,38	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Anes.	Kan	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Göğüs	T.A.	64	32	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
30	Göğüs	T.A.	2	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Anes.	Kan	16	2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
32	Dahiliye	Kan	0,19	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
33	Anes.	Kan	32	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
34	Enf.	Blg	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
35	Cerrahi	Yara	64	1,5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
36	Cerrahi	T.A.	32	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
37	Cerrahi	Yara	64	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
38	Enf.	Yara	1	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
39	Enf.	Yara	128	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
40	Anes.	T.A.	64	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
41	Cerrahi	Yara	32	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
42	Enf.	Yara	24	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
43	Göğüs	Blg	2	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Anes.	T.A.	32	24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
45	Ortop.	Yara	48	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
46	Cerrahi	İdrar	256	8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
47	Cerrahi	T.A.	3	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
48	Göğüs	Blg	2	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Cerrahi	T.A.	32	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
50	Cerrahi	BOS	48	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
51	Cerrahi	İdrar	1,5	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
52	Göğüs	T.A.	64	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
53	Nöro.	T.A.	32	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
54	Çocuk	BOS	16	2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
55	Cerrahi	Yara	32	2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
56	Cerrahi	Blg	192	48	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
57	Çocuk	T.A.	2	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
58	Dahiliye	Kan	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
59	Dahiliye	Blg	32	4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
60	Cerrahi	Yara	32	24	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
61	Enf.	Yara	64	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
62	Anes.	T.A.	48	64	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
63	Cerrahi	T.A.	64	64	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
64	Cerrahi	Yara	24	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
65	Dahiliye	Yara	192	32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
66	Cerrahi	Yara	1	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
67	Ortop.	Yara	8	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
68	Cerrahi	T.A.	256	32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Ortop.	Yara	8	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
70	Dahiliye	Kan	64	32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
71	Dahiliye	İdrar	128	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
72	Göğüs	Blg	256	96	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
73	Dahiliye	T.A.	2	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
74	Anes.	Kan	192	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
75	Göğüs	T.A.	16	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
76	Göğüs	T.A.	12	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
77	Cerrahi	Yara	256	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
78	Göğüs	T.A.	256	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
79	Enf.	Blg	3	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
80	Nöro.	Yara	32	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
81	Göğüs	T.A.	24	24	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
82	Enf.	Blg	3	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
83	Dahiliye	T.A.	32	12	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
84	Anes.	Kan	16	12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
85	Cerrahi	Yara	32	64	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
86	Dahiliye	T.A.	6	8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
87	Dahiliye	Blg	0,5	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
88	Nöro.	Yara	32	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
89	Göğüs	Kan	24	32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
90	Nöro.	Blg	48	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
91	Cerrahi	Yara	16	2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
92	Çocuk	İdrar	1	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
93	Göğüs	T.A.	24	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
94	Cerrahi	İdrar	4	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
95	Çocuk	Yara	48	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
96	Ortop.	Yara	2	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
97	Cerrahi	Kan	1	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
98	Dahiliye	Blg	16	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
99	Ortop.	Yara	2	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
100	Dahiliye	Yara	16	1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
101	Göğüs	Kan	48	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
102	Cerrahi	Yara	128	4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
103	Cerrahi	İdrar	256	1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
104	Nöro.	Blg	2	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
105	Nöro.	İdrar	3	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
106	Nöro.	İdrar	2	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
107	Göğüs	Blg	2	48	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
108	Cerrahi	Yara	48	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
109	Dahiliye	Yara	2	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
110	Cerrahi	Yara	48	12	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
111	Cerrahi	Yara	64	2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
112	Anes.	T.A.	256	4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
113	Dahiliye	Blg	96	16	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
114	Göğüs	İdrar	3	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
115	Nöro.	T.A.	4	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
116	Anes.	Kan	0,5	6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
117	Göğüs	Blg	16	32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
118	Göğüs	Blg	0,38	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
119	Ortop.	Yara	1,5	0,38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
120	Dahiliye	T.A.	1,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
121	Nöro.	T.A.	64	32	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
122	Ortop.	Yara	8	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
123	Cerrahi	Yara	0,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
124	Dahiliye	Blg	1,5	8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
125	Ortop.	Yara	32	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
126	Anes.	Kan	16	0,19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
127	Cerrahi	Yara	1	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
128	Anes.	T.A.	1	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
129	Anes.	T.A.	1	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
130	Enf.	Yara	48	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
131	Dahiliye	Plevra	3	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
132	Göğüs	T.A.	1,5	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
133	Ortop.	Yara	1	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
134	Cerrahi	Yara	0,75	0,38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
135	Anes.	Kan	16	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
136	Göğüs	T.A.	16	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
137	Dahiliye	İdrar	1,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
138	Dahiliye	Yara	32	4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
139	Dahiliye	Yara	0,38	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
140	Anes.	T.A.	0,75	0,75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
141	Anes.	Blg	32	0,75	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
142	Anes.	T.A.	64	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
143	Anes.	İdrar	64	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
144	Ortop.	Yara	0,38	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
145	Anes.	Kan	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
146	Göğüs	T.A.	64	32	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
147	Göğüs	T.A.	2	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
148	Anes.	Kan	16	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
149	Dahiliye	Kan	0,19	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
150	Anes.	Kan	1,5	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
151	Enf.	Blg	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
152	Cerrahi	Yara	64	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
153	Cerrahi	T.A.	32	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
154	Cerrahi	Yara	64	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
155	Enf.	Yara	1	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
156	Enf.	Yara	128	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
157	Anes.	T.A.	64	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
158	Cerrahi	Yara	32	32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
159	Enf.	Yara	24	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
160	Göğüs	Blg	2	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
161	Anes.	T.A.	3	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
162	Ortop.	Yara	16	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
163	Cerrahi	İdrar	256	8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

Suş No	Servis	Örnek Türü	CAZ E Test (µg/ml)	IPM E Test (µg/ml)	MBL E Test	ESBL	IBL	GES-1	PER	KPC	VIM-2	IMP-1	OXA-10	OXA-14	ABC*
164	Cerrahi	T.A.	3	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
165	Göğüs	Blg	2	24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
166	Cerrahi	T.A.	32	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
167	Cerrahi	Yara	1,5	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
168	Cerrahi	İdrar	64	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
169	Göğüs	T.A.	2	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
170	Nöro.	T.A.	48	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
171	Çocuk	Kan	32	2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
172	Cerrahi	Yara	32	2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
173	Cerrahi	Blg	192	48	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
174	Çocuk	BOS	2	1,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
175	Dahiliye	Kan	1,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
176	Dahiliye	Blg	32	6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
177	Cerrahi	Yara	32	24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
178	Enf.	Yara	64	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
179	Anes.	T.A.	48	64	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
180	Cerrahi	T.A.	64	64	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
181	Cerrahi	Yara	24	32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
182	Dahiliye	Yara	192	32	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
183	Cerrahi	Yara	1	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
184	Cerrahi	Yara	1,5	4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
185	Dahiliye	Blg	1	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
186	Enf.	İdrar	1,5	32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
187	Anes.	Kan	0,5	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
188	Dahiliye	İdrar	1,5	0,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
189	Dahiliye	Blg	1	0,1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
190	Göğüs	T.A.	1	0,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
191	Cerrahi	İdrar	64	32	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
192	Göğüs	Blg	0,5	0,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
193	Nöro.	T.A.	4	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
194	Nöro.	T.A.	16	12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
195	Cerrahi	Yara	1,5	0,5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* ATP-binding cassette (ABC) transporter permease

5. TARTIŞMA

P. aeruginosa normal koşullarda insan florasında bulunmayan gram negatif bir fırsatçı bir patojendir. Bu mikroorganizma genellikle toprak, su, sebze ve meyve ve çürümüş organik maddeler üzerinde bulunmaktadır (58). Normal koşullarda sağlıklı bireylerde hastalığa sebep olmamasına rağmen, birçok hastane enfeksiyonuna neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* özellikle savunma sisteminin zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalıklarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir (59). *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almaktadır. Çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmesi sebebiyle oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (60).

Bulgaristan'da 2001-2006 yıllarını kapsayan bir sürveyans çalışmasında *P. aeruginosa* suşlarının örnek dağılımı cerrahi, ortopedi, dahiliye, pediatri, nöroloji ve yoğun bakım şeklindedir. Çalışılan 203 *P. aeruginosa* suşunun 79'u idrar, 27'si trekeal asparat, 26'sı balgam, 2'si plevral sıvı, 39'u cerrahi yara, 9'u kan ve 21'i örnek diğer vucut sıvılarından izole edilmiştir (61). Aynı şekilde Kanada'da yapılan bir çalışmada da 241 imipenem dirençli *P. aeruginosa* suşunun 103'ü (%43) idrardan, 7'si (%3) kandan, 50'si (%21) yara'dan, 48'i (%20) solunum sistemi salgılarından ve kalan 23'ü (%9) diğer klinik salgılardan izole edilmiştir (62). Bonfiglio ve ark. 1998 yılında 1153 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada %35 solunum yolu sekresyonları, %22 idrar, %18 deri ve yumuşak doku, %4 kan, %3 kulak sürüntüsü, %15 diğer, Hamze ve ark. 2004 yılında 464 suş ile yaptıkları çalışmada %39,3 idrar, %21,2 yara ve %16,5 oranında kulak sürüntülerinden *P. aeruginosa* izole ettiklerini bildirmişlerdir (63, 64).

Ülkemizde de klinik örneklerden *P. aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Yücel ve ark. *P. aeruginosa* suşlarını, trekeal asparat (%22), idrar (%22), yara (%15), balgam (%14) ve kan (%8) örneklerinden saptamışlardır (58). Özdemir ve ark. 2009 yılında

yaptıkları bir çalışmada örnek dağılımını %33 trakeal aspirat, %32 yara, %24 bronkoalveolar lavaj ve %6 kan kültürü olarak bildirmişlerdir (65). Yine ülkemizde 2010 yılında Aktaş ve ark. yaptığı bir çalışmada %47 trakeal aspirat, %20 yara yeri, %13 kan kültürü, %10 idrar şeklinde dağılım tespit etmişlerdir (66). Öztürk ve ark. 2010 yılında yaptığı bi çalışmada örnek türlerinin dağılımı %52 trakeal aspirat, %26 yara yeri, %13 idrar, %6 kan kültürü, olarak raporlanmıştır (67). Çalışmamıza dahil edilen örneklerde ise bu oran 67 (%34,4) yara, 53 (%27,2) trakeal aspirat, 29 (%14,9) balgam, 23 (%11,8) kan, 18 (%9,2) idrar, 3 (%1,5) beyin omirilik sıvısı ve 2 (%1) plevral sıvı olarak saptanmıştır.

Tablo XVII. Örnek tipi dağılımı açısından yurt içi ve yurt dışı veriler

	TRAKEAL ASPIRAT	YARA	İDRAR	KAN	BALGAM	DİĞER
Bonfiglio ve ark. 1998	%35	%18	%22	%4	-	%21
Hamze ve ark. 2004	-	%21,2	%39,3	-	-	%39,5
Pitout ve ark 2005	%20	%21	%43	%3	-	%13
Yücel ve ark 2006	%22	%15	%22	%8	%14	%19
Strateva ve ark 2007	%13,3	%19,2	%38,9	%4,4	%12,8	%11,4
Özdemir ve ark. 2009	%33	%32	-	%6	%24	%5
Aktaş ve ark. 2010	%47	%20	%10	%13	-	%10
Öztürk ve ark. 2010	%52	%26	%13	%6	-	%3
Bu Çalışma 2013	%27,2	%34,4	%9,2	%11,8	%14,9	%2,5

P.aeruginosa birden fazla mekanizma ile çoklu ilaç direncine neden olmaktadır. Florokinolon direncine topoizomera II ve IV'de meydana gelen mutasyonlar neden olmakta, penisilin, sefalosporin ve karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gelişimine ise kromozomal AmpC beta laktamaz üreten suşlarda enzimin dereprese olması sebep olmaktadır. *P.aeruginosa*'da pek çok antibiyotik grubuna çeşitli karşı direnç gelişiminden ilaç atım pompaları sorumludur. Örneğin, MexAB-OprM pompası florokinolon, penisilinler, sefalosporinler ve karbapenem grubu içinde yer alan meropenem karşı direnç gelişiminden sorumludur. MexCD-OprJ ve MexEF-OprN pompaları florokinolonlara, MexXY-

OprM ise aminoglikozitlere dirence yol açan mekanizmalar içinde yer almaktadır. *P.aeruginosa*'da dış membran geçirgenliğinin bozulması ise sadece imipenem direncine neden olmaktadır (68). Ancak yapılan çalışmalarda MexEF-OprN atım pompasının regülatörü olan *mexT* geninde meydana gelen mutasyonun MexEF-OprN ekspresyonunu arttırırken dış membran geçirgenliğinden sorumlu OprD ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu durum izolatin florokinolonların yanı sıra imipeneme karşı da direnç geliştirmesini sağlamaktadır (69, 70).

P.aeruginosa'da ilaç direncine neden olan diğer bir mekanizma, antibiyotikleri inaktive edebilen enzimlerin bulunmasıdır. Aminoglikozit inaktivasyonuna sahip olan aminoglikozit asetiltransferaz ve adeniltransferaz, özellikle seftazidim direncine neden olan PER-1, sefalosporin, monobaktam ve penisilin direncine yol açan OXA tipi geniş spektrumlu beta laktamazlar bu enzimler içinde sayılabilir (71).

Amerika Birleşik Devletleri, Meksika ve Brezilya'dan 2000 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında, imipenem direnci %25, meropenem direnci %23, seftazidim direnci %21, siprofloksasin direnci %25 ve tobramisin direnci %19 olarak saptanmıştır (72). Yunanistan'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında anti-pseudomonal ajanlardan seftazidime %27, siprofloksasine %35, amikasin %21, aztreonam %24 oranlarında direnç bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada Yunanistan'da 1996-1998 yılları arasında karbapenem direnci %19 iken 2003 yılında yayınlanan raporda karbapenem direncinin %35'e yükseldiği belirtilmektedir (73, 74). Benzer şekilde Polonya'da yapılan bir çalışmada 1997 yılında *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnci %7,9 iken 2001 yılında bu oran %19,3'e yükselmiştir (75). Kore'de 1995'de *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin %3, 1997'de %16 2001'de ise %21'e yükseldiği saptanmıştır (76, 77). Latin Amerika'da 1997-2001 yılları arasında hospitalize hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin %17'den %35,6'ya yükseldiği rapor edilmiştir (78). Martinez ve ark. İspanya'da 2003 yılında yaptığı bir çalışmada %20,2 gentamisin, %14,4 siprofloksasin, %18,2 levofloksasin, %9,6 imipenem, %6,1 meropenem, %40 seftazidim, %8 tazobaktam piperasilin, ve %28 sefepim direnci bildirmişlerdir (79). Brezilya'da 2012 yılında hastanede yatan hastalardan izole edilen 61 *P.aeruginosa*

suşu ile yapılan bir çalışmada %34 amikasin, %41 gentamisin, %41 siprofloksasin, %29 aztreonam, %34 sefepim, %32 seftazidim, %32 imipenem ve %37 meropenem direnci saptanmıştır (80). Yine 2012 yılında Pakistanda yapılan bir çalışmada 120 suşun %24'ü imipeneme, % 35'i amikasin, %45'i tazobaktam/piperasiline ve %40'ı sefepime dirençli olarak raporlanmıştır (81). İran'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada yanık ünitesinde yatan 182 hastanın 86'sında *Pseudomonas aeruginosa* üremiş ve antibiyotik direnci sefazolin %83,7, piperasilin %69,9, seftazidime %68,8, siprofloksasin %66,3, tobramisin %58,2, amikasin %48,8, gentamisin %37,2 ve imipenem %23,3 olarak tespit edilmiştir (82).

Ülkemizde Yücel ve ark. 2003, 2004 ve 2005 yılları arasındaki direnç artışlarını incelediği bir çalışmada seftazidim, sefepim, aztreonam, piperasilin/tazobaktam ve siprofloksasine anlamlı bir direnç artışı bildirilmiştir (58). Öztürk ve ark. 2010 yılında yaptığı bir çalışmada 97 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun %10'u amikasin, %32'i gentamisin, %87'si sefepim, %30'u seftazidim, %16'sı siprofloksasin, %25'i imipenem, %28'i piperasilin dirençli olarak bulunmuştur (67). Van bölgesinde Berktaş ve ark. 2008-2009 tarihleri arasında izole ettikleri 75 suşun direnç oranları %9 amikasin, %75 gentamisin, %40 seftazidim, %32 siprofloksasin, %44 levofloksasin, %60 imipenem, %79 piperasilin ve %55 aztreonam direnci saptanmıştır (83). Tunçoğlu ve ark. 179 suş ile yaptığı 2005-2006 ve 2007-2008 yılları arasındaki direnç artışını incelediği çalışmada sefepim direncinin %29'dan %48'e, seftazidim direncinin %12'den %32'ye, aztreonam direncinin %27'den %60'a imipenem direncinin %0'dan %15'e, meropenem direncinin %2'den %15'e çıktığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada amikasin ve gentamisin direncinde anlamlı bir artış olmadığı belirtilmiştir (84). Özdemir ve ark. 2009 yılında 158 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada %24 amikasin, %36 seftazidim, %43 sefepim, %44 siprofloksasin, %48 aztreonam, %50 levofloksasin, %54 imipenem direncini bildirilmiştir (65). Özyurt ve ark. 2010 yılında İstanbul bölgesinde yaptıkları çalışmada amikasin %17,6, gentamisin %44,9, levofloksasine %21,2, siprofloksasine %20, seftazidime %64,3, sefepime %45,1, aztreonama %60,3, imipeneme %22,9 ve meropeneme %18,9 oranlarında direnç saptamışlardır(85).

Çalışmamızda seftazidime %100,0, gentamisine %11,8, tobramisine %6,2, piperasilin %44,1, amikasinine %8,7, aztroenama %60,5, sefepime %50,2, siprofloksasine %26,2, levofloksasine %31,3, imipeneme %48,2, meropeneme %47,2, tazobaktam-piperasiline %90,8 ve ofloksasine %47,2 oranlarında direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızda E test ile 105 izolatın seftazidim dirençli olduğu saptanmasına rağmen disk difüzyon ile 195 izolat dirençli olarak rapor edilmiştir. Bu, İBL tespit edilen örneklerin penisilinlere, sefalosporinlere ve beta laktam / beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına dirençli olarak raporlanmasından kaynaklanmaktadır.

P. aeruginosa suşlarında artan antibiyotik direnç oranları son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır *P. aeruginosa* genellikle çoklu antibiyotik direnci gösterebildiğinden tedavilerde zorluklara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanımda olan antibiyotiklere karşı duyarlılığının izlenmesi uygun tedavi yönteminin saptanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Çeşitli direnç mekanizmalarına sahip olan *P.aeruginosa*'nın hastane kaynaklı suşlarının direnç oranlarının belirlenmesinin, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların ampirik tedavisine yardımcı olacağı düşünülmektedir (86).

Tablo XVIII. Yurt içi ve yurt dışı çalışmalarda bildirilen direnç oranları (%)

	AMİKASİN	GENTAMİSİN	SİPROFLOKSASİN	LEVOFLOKSASİN	MEROPENEM	İMİPENEM	AZTREONAM	SEFTAZİDİM	TAZOBAKTAM PİPERASİLİN	SEFEPİM
Pfaller ve ark. 2000	19	-	25	-	23	25	-	21	-	-
Tsakris ve ark. 2000	21	25	35	-	11	38	24	27	26	-
Martinez ve ark. 2003	-	20,2	14,4	18,2	6,1	9,6	-	40	8	28
Yücel ve ark. 2006	26	42	30	-	-	31	35	40	29	34
Özdemir ve ark. 2009	24	52	44	50	-	54	48	36	-	43
Tunçoğlu ve ark. 2009	5,6	16,2	22,9	-	9,5	7,8	44,7	22,9	-	39,1
Öztürk ve ark. 2010	10	32	16	-	-	25	-	30	-	87
Özyurt ve ark. 2010	17,6	44,9	20	21,2	18,9	22,9	60,3	64,3	-	45,1
Berktaş ve ark. 2011	9	75	32	44	-	60	55	40	-	-
Nikokar ve ark. 2013	48,8	37,2	66,3	-	-	23,3	-	68,8	-	-
Bu çalışma 2013	8,7	11,8	26,2	31,3	47,2	48,2	60,5	100,0	90,8	50,2

Yurt dışında Wolska ve ark. 2001 yılında yaptığı bir çalışmada %72 oranında İBL pozitifliği saptarken, 2008 yılında yaptığı çalışmada ise bu oran %98,5 olarak tesbit edilmiştir (87, 88). Yurt içinde yapılan çalışmalara ait yapılan bildirimlerden elde edilen verilerde; Elşi ve ark. 2007 yılında 51 *P.aeruginosa* suşunun %52'sinde, Özyurt ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada 350 *P. aeruginosa* suşunun %62'sinde, Berktaş ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada 87 *P. aeruginosa* suşunun %74'ünde İBL pozitifliği bildirmişlerdir (85, 89, 90).

Araştırmamız kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 174 (%89,2) İBL pozitifliği saptanmıştır. Bu oran ülkemizden gerçekleştirilen bildirimlere oranla oldukça yüksektir.

Antibiyotik duyarlılıkları ile ilişkili olarak yurt içi ve yurt dışından yapılan çalışmalardaki birçok veri bizim verilerimizle uyumluyken özellikle seftazidim ve tazobaktam/piperasilin direnci bölgemizde yüksek saptanmıştır. Bunun bedeni olarak

İBL pozitif değerlendirdiğimiz örneklerde seftazidim invitro duyarlı olsa bile dirençli olarak raporlanması olduğu düşünülebilir. İmipenem direnci de sınır değere yakın bulunmuştur. Bu farklılığı ortaya çıkaran nedenlerin bölgesel farklılıklar, toplumsal farklılıklar ve yaşam tarzları, hastanelerin uyguladığı enfeksiyon kontrol önlemleri, ampirik tedavi tercihleri, hasta uyumu ve ilaç kullanım politikaları olabileceği düşüncesindeyiz.

Tablo XIX. Hastanemizde daha önce yapılan iki araştırmanın antibiyotik direnç oranları (%) (91, 92)

	Çiftci ve ark.(2005) n: 101	Aktepe ve ark.(2010) n: 123	Bu çalışma(2013) n: 195
Amikasin	15	4,9	8,7
Gentamisin	64	18,7	11,8
Siprofloksasin	35	33,3	26,2
Levofloksasin	-	39	31,3
Meropenem	20	26	47,2
İmipenem	22	26,8	48,2
Sefepim	37	74,8	50,2
Seftazidim	43	69,9	100,0
Ofloksasin	-	41,5	47,2
Aztreonam	-	78,9	60,5

Çalışmamızda imipenem, meropenem, aztreonam, siprofloksasin, levofloksasin, tazobaktam/piperasilin ve ofloksasin antibiyotiklerinin yıllara göre dağılımı analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusu olduğu saptanmıştır.

Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençten birçok mekanizma sorumlu olabilmektedir. Bakterinin ilaç atım pompası, dış membran geçirgenliğinin azalması, bazı OXA tipi geniş spektrumlu beta laktamazlar ve yüksek düzeyde kromozomal AmpC enzimi sentezleyen dereprese mutantların varlığı nedeniyle karbapenem direnci oluşturabildiği bilinmektedir. Ancak son yıllarda üzerinde en çok durulan karbapenem direnç mekanizması, metallo beta laktamazların varlığıdır

(93). Metallo beta laktamaz enziminden sorumlu gen, integron içerisinde yer alan gen kasetlerinde bulunmaktadır. İntegronlar, kendi başlarına hareket kabiliyeti olmayan, içinde bir veya birden fazla gen kaseti taşıyabilen genetik elemanlardır (94). Metallo beta laktamaz genlerini taşıyan integronlarda, sıklıkla aminoglikozit direncine neden olan enzimleri kodlayan gen kasetleri de bulunmaktadır. Bu durumda bakteri beta laktam antibiyotiklerin yanında aminoglikozitlere de direnç geliştirebilmektedir (95).

Walsh ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, daha önce metallo beta laktamaz ürettiği saptanmış ve imipenem MİK değeri 4 µg/ml olan izolatların büyük bir çoğunluğunun E-test ile pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, E-testin metallo beta laktamazın fenotipik tayinindeki duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %95 olarak belirlenmiştir (57). İtalya’da 2004 yılında yapılan bir çalışmada imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında metallo beta laktamazın fenotipik tayininde kullanılan E-test ile yanlış pozitif sonuçlar alındığı belirtilmektedir (93). Walsh ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, E-test ile pozitif bulunan 31 *P.aeruginosa* izolatının 25’i PZR analizi ile metallo beta laktamaz açısından doğrulanabilmistir (96). Latin Amerika ülkelerini kapsayan bir çalışmada ise, E-test ile pozitif bulunan 54 *P.aeruginosa* izolatının PZR analizi ile sadece 25’inde metallo beta laktamaz geni gösterilebilmiştir (97). Çakar ve ark. 2005 yılında yaptığı 110 *P.aeruginosa* ile yapılan çalışmada 25 suşta E test ile metallo beta laktamaz üretimi tespit edilmiş bu örneklerin 11’inde VIM direnç geni moleküler olarak gösterilmiştir (7). Bozçal ve ark. tarafında İzmir bölgesinde 2009 yılında yapılan çalışmada 80 *P.aeruginosa* suşunun 27’sinin fenotipik olarak metallo beta laktamaz ürettiği bulunmuş bunlardan 7’sinde VIM, 1’inde IMP enzimleri moleküler olarak saptanmıştır (98).

Metallo beta laktamaz varlığının tespitinde PZR analizi güvenilir bir yöntemdir. PZR analizinde VIM veya IMP genlerinin korunmuş bölgelerine özgü farklı primer setleri kullanılabildiği gibi enzime özgül primer seti de kullanılabilmektedir. Enzim tiplendirmesinde ise PZR sonucu elde edilen amplikonun sekans analizinin yapılması gerekmektedir. Çünkü VIM benzeri ya da IMP benzeri enzimler birbirlerinden genellikle bir veya iki aminoasit farkla

ayrılmaktadır. Avrupa’da IMP benzeri enzimlerin çok nadir, VIM benzeri enzimlerin ise oldukça yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir. Çalışmamızda VIM ve IMP gen bölgelerine ait iki adet konsensus primer seti kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 195 *P.aeruginosa* izolatının 52’sinde E test ile metallo beta laktamaz üretimi saptanmış, PZR ile 4 izolatta VIM geni, 2 izolat ise IMP geni gösterilmiştir. Bu izolatların dizi analizleri sonuçlarına göre bunların VIM-2 ve IMP-1 oldukları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde saptanan sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

PER-1 enzimi, ilk kez 1991 yılında Fransa’da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (52). Fransa, İtalya, Belçika ve Kore gibi ülkelerde de PER-1 enzimi saptanan *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus mirabilis* ve *Alcaligenes faecalis* suşları bildirilmiştir (99, 100). 2001-2002 yılları arasında orta Fransa’da dokuz hastanenin katılımıyla gerçekleştirilen çalışmada toplam 5304 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatından 37’sinde (%0,7) PER-1 geni varlığı tespit edilmiştir (101). 1991-1993 yılları arasında Ankara’da seftazidim dirençli 14 *P. aeruginosa* suşunda da PER-1 enzime rastlanmış, ardından ülke çapında gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada söz konusu enzimin *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında da yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır (102). İstanbul’da Çelik ve ark. 2007 yılında seftazidim dirençli 50 *P.aeruginosa* ile yaptığı bir yayında 22 örnekte PER-1 enzimi saptamışlardır (4). Samsun bölgesinde 2008 yılında Söğüt ve ark. yaptığı bir çalışmada 50 seftazidim dirençli *P.aeruginosa* izolatının 23’ünde PER-1 enzimi tesbit edilmiştir (18). Bizim çalışmamızda 56 örnekte GSBL saptamamıza rağmen PER-1 direnç geni saptanamamıştır.

OXA-10 türevi enzimlerden OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17, ilk olarak Ankara’da Gür ve ark. tarafından izole edilmiştir (103). İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde yapılan çalışmada, 50 adet seftazidime dirençli *P. aeruginosa* suşunun 23’ünde (%46) OXA-10 türevi enzimler saptanmıştır (4). OXA türevleri, GSBL tipi OXA enzimlerini genel olarak içerdiği için çalışmamızda, OXA gen bölgesine yönelik ortak primer kullanılmıştır ve toplam 9 izolatta OXA türevi GSBL enzimi pozitif olarak bulunmuştur. Dizi analizleri yapılan izolatların 5’i OXA-10 olarak saptanırken 4’ü OXA-14 olarak belirlenmiştir.

İlk GES tipi GSBL enzimi 1998 yılında Fransa'da izole edilen bir *K.pneumoniae* suşunda bulunmuştur. GES-1 Fransa'dan; GES-2 Güney Afrika'dan; GES-3, GES-4, GES-7 ve GES-8 Yunanistan'dan; GES-5 ve GES-6 Japonya'dan bildirilmiştir. GES-3 Yunanistan'dan sonra Kore'de de saptanmıştır (104, 105, 106). 2004 yılında Japonya'da Wachino ve ark.'nın yaptığı çalışmada bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç gösteren altı *K.pneumoniae* klinik izolatında GES-3 enziminin varlığı gösterilmiştir (45). Poirel ve ark.'nın 2000'de yaptığı çalışmada Güney Afrikada Zimbabwe'li bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* suşunda GES-2 enzimi bulunmuştur (107). GES tipi enzimler *Enterobacter* cinsi bakterilerde görülen IBC tipi enzimlerle yapısal olarak büyük benzerlik taşımaktadır. GES ve IBC enzimleri, her iki grubu birlikte saptayan GES/IBC ortak primerlerinin kullanıldığı PZR deneyleriyle tanımlanmakta, ancak GES tipi ve IBC tipi enzimlerin ayrımı için mutlaka dizi analizi gerekmektedir. GES-1 geni Fransa'da bir *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiş ve Yunanistan'da izole edilmiş olan IBC-2 geni ile yapısal olarak ilişkili bulunmuştur. IBC-2; GES-1'den bir, IBC-1'den iki aminoasit farklılığı göstermekte; GES-2 de GES-1'den bir aminoasit farklılığı göstermektedir. Ancak GES-2, GES-1'den farklı olarak genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin yanı sıra imipenemi de hidrolize etmektedir ve karbapenemaz özelliğindedir; GES-1 ise GSBL enzimidir ve sefoksitine yüksek afinite gösterir ancak diğer GSBL enzimlerinden farklı olarak aztreonama karşı hidrolitik aktivitesi yoktur (47). Ülkemizde 2007 yılında Çelik ve ark. seftazidim dirençli 50 *P.aeruginosa* izolatı ile yaptığı bir çalışmada 43 örnekte GES enzimi pozitif olarak bulunmuştur (4). Çalışmamızda 195 örnekten 113'ünde GES pozitifliği saptanmıştır. Ancak dizi analizi sonuçlarında 113 izolattan 26'sının GES-1 GSBL enzimi taşıdığı geri kalan 87 izolatın aynı primer dizileri ile saptanan ABC transporter permease proteini taşıdığı gösterilmiştir. Bu proteinin efluks pompa sistemi aracılığıyla antibiyotik direncinden sorumlu olabileceğini gösteren yayınlar mevcuttur (108). Ayrıca bu proteinin siderofor özellik gösteren pigment üretiminden sorumlu olduğu ve bakterinin virulans faktörleri ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (109, 110, 111). Tüm bu veriler GES/IBC enzimlerinin ülkemizde de yaygın olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu konu ile ilgili daha detaylı ileri çalışmalar yapılması, daha net sonuçlar alınmasına olanak sağlayabilecektir.

6. SONUÇ

Antibiyotik direnci tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmaları bilinmeli ve direnç gelişimi önlenmelidir. Beta laktamazların ve bu beta laktamazları kodlayan genleri taşıyan kökenlerin saptanması enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve enfeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

Çalışmamızın sonuçları, Dünya literatürü ile benzer olarak dirençli *P. aeruginosa* izolatları ile oluşan enfeksiyonların giderek arttığını göstermektedir. *P.aeruginosa*'nın klinik materyallerden artan izolasyon sıklığıyla birlikte antibiyotik direnç profillerinin de değiştiği görülmektedir. Hastane enfeksiyonu etkeni izolatlar arasında çoklu ilaç dirençli suşların artış göstermesi, hastane kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının takip edilmesini gerektirmektedir. Bu sayede profilaktik antibiyotik seçiminde doğru yaklaşımın, doğru tedavinin uygulanması mümkün olabilecektir.

Çalışmamız dahilindeki suşlarda yapılan disk difüzyon testi sonuçlarına göre; beta laktam halkası içeren antibiyotiklere yüksek oranlarda direnç saptanmıştır. Hastanemizde saptanan *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında en etkili antibiyotiklerin aminoglikozid ve kinolon grubu olduğu tespit edilmiştir.

P. aeruginosa hastane enfeksiyonlarında sık rastlanan, kullanılan antimikrobiyallere hızla direnç geliştirebilen ve bu direnci aktarabilen bir bakteridir. Tedavide önemli bir seçenek olan karbapenemleri de içine alan antimikrobiyal direnç ve çoklu direnç paternleri nedeniyle bir *P. aeruginosa* suşunun hangi antibiyotiklere duyarlı olabileceğini kestirmek zordur. Bu yüzden kombine tedaviler düşünülmelidir.

MBL'ler aztreonam dışındaki beta laktam antibiyotiklere direnç oluşumunun önemli nedenlerinden biridir. Günümüzde MBL rutin olarak tespit edilmemektedir,

bu enzimlerin epidemiyolojik açıdan tanımlanarak direnç yayılımının kontrol edilmesi büyük önem taşıdığından karbapenem dirençli kökenlerde MBL varlığı akılda tutulmalıdır. Çalışmamızda imipenem dirençli 94 (%48,2) suş olmasına rağmen 52 (%26,6) kökende E test yöntemi ile MBL üretimi saptanmıştır. MBL üretimi tespit edilmeyen suşlardaki karbapenem direncinin eflux pompa sistemleri gibi diğer mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

PZR analizi sonucunda 4 izolatın VIM-2, 2 izolatın ise IMP-1 metallo beta laktamaz geni taşıdığı saptanmıştır. Hastane ortamında dirençli izolatların yayılmasını önlemek oldukça önemlidir. Bu nedenle bundan sonraki hedef metallo beta laktamazları güvenilir, hızlı ve kolay tanımlayabilecek testlerin geliştirilmesi için çalışmaların devam etmesi olmalıdır.

OXA grubu gen bölgeleri saptanan tüm suşlarda seftazidim MİK değerinin 16 µg/ml ve üzerinde olması OXA grubu enzimlerin seftazidime karşı yüksek etkinliğinin olduğu sonucunu desteklemiştir.

PZR analizi sonucu 113 izolatta tespit edilen GES gen bölgesinin dizi analizi sonucu 26'sının GES-1 gen bölgesi taşıdığı gösterilmiştir. Bu oran ülkemiz için *P.aeruginosa*'larda GES-1 enziminin antibiyotik direncinde etkili olduğunu göstermektedir. Diğer 87 izolatta ise aynı primer dizileri ile saptanan ABC transporter permease gen bölgesi tespit edilmiştir. Bu proteinin bakterinin pigment üretiminden sorumlu olduğu ve bakteriyel direnç gelişiminde etkili olan efluks pompa sistemleri ile ilişkisinin olabileceği düşünülmektedir.

7. ÖZET

Pseudomonas aureginosa doğada çok yaygın olarak bulunur ve organik materyalin yeniden düzenlenmesinde, önemli rol oynar. Çoğu türler bitki ve hayvanlar için patojendir. *P.aeruginosa* fırsatçı patojen enfeksiyonlara neden olmaktadır. Sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa sebep olur. Sağlıklı bireylerde perine, dış kulak yolu, aksilla, alt gastrointestinal sistem gibi nemli alanlarda kolonize olabilir. Mekanik ventilasyon altındaki erişkinler veya nütropenik hastalar, özellikle geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi sırasında veya sonrasında *P.aeruginosa*'ya bağlı ventilatör kaynaklı veya diğer pnömoniler açısından büyük risk altındadırlar.

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yatmakta olan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespit edilmesi, PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA gibi direnç enzimlerinin fenotipik ve genotipik olarak saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan 195 *P.aeruginosa* örneğinin antibiyotik direnç oranları seftazidime %100, gentamisine %11,8, tobramisine %6,2, piperasilin %44,1, amikasinine %8,7, aztroenama %60,5, sefepime %50,2, siprofloksasine %26,2, levofloksasine %31,3, imipeneme %48,2, meropeneme %47,2, tazobaktam-piperasiline %90,8 ve ofloksasine %47,2 şeklinde tespit edilmiştir. Çift disk indüksiyon yöntemi ile 195 suştan 174'inde indüklenebilir beta laktamaz tespit edilmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ile taranan 195 örneğin 60'ında GSBL pozitifliği saptanmıştır. 52 suşta MBL E test ile metallo beta laktamaz enzimi fenotipik olarak tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalar ve dizi analizleri sonucunda 5 izolatta OXA-10, 4 izolatta OXA-14, 4 izolatta VIM-2, 2 izolatta IMP-1, 26 izolotta GES-1 ve 87 izolatta ABC transporter permease geni saptanmıştır. PER ve KPC enzimlerine rastlanmamıştır.

Antibiyotik direnci tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmaları bilinmeli ve direnç gelişimi önlenmelidir. Beta laktamazların ve bu beta laktamazları kodlayan genleri taşıyan kökenlerin saptanması enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve enfeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

8. SUMMARY

Molecular Epidemiology of Beta Lactamases in Ceftazidime Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Pseudomonas are widely distributed in nature and plays an important role in the regulation of organic material. Most species are pathogenic for plants and animals. *P. aeruginosa* causes opportunistic infection and rarely causes disease in healthy people. It may be colonized in healthy individuals with the perineum, the external auditory canal, axilla, sub-humid areas, such as the gastrointestinal tract. Neutropenic patients or adults under mechanical ventilation are at greater risk, especially, during or after treatment with broad spectrum antibiotics, *P. aeruginosa* due to ventilator associated pneumonia.

In this study, we aimed to submit antibiotic susceptibilities of *P. aeruginosa* strains and was to determine phenotypic and genotypic resistance enzymes such as PER, GES, KPC, VIM, IMP and OXA in hospitalized patients at Afyon Kocatepe University School of Medicine.

Antibiotic resistance rates in the study with 195 samples of *P. aeruginosa* ceftazidime 100%, gentamicin 11.8%, tobramycin 6.2%, piperacilin 44.1%, amikacin 8.7%, aztroenam 60.5%, cefepime 50.2%, ciprofloxacin 26.2%, levofloxacin 31.3%, imipenem 48.2%, meropenem 47.2%, tazobactam piperacillin 90.8% ve ofloxacin 47.2%. Inducible beta lactamase studied with double disk induction method and 174 strains were pozitive. 60 of 195 samples were positive for ESBL scanned by double-disk synergy test. Metallo beta lactamase enzymes were determinated by phenotypically MBL E test in 52 strains. OXA-10, OXA-14, VIM-2, IMP-1, GES-1 and ABC transporter permease gene were detected 5, 4, 4, 2, 26 and 87 samples respectively, by molecular methods and sequencing.

Antibiotic resistance is a serious public health problem in our country, as well as all over the world. Therefore, the antibiotic resistance mechanisms should be known and prevent the development of resistance. Strains carrying genes encoding beta lactamases and detection of beta lactamases leads the selection of antibiotics used in the treatment of infectious diseases, treatment follow-up, the prevention of infectious diseases and the development of infection control programme.

9. KAYNAKLAR

1. Erdem B. Pseudomonaslar. In: Ustaelebi Ő. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Gneő Kitabevi, Ankara, 1999; 551-566.
2. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram Olumsuz Bakteriler. In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji zel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir, 1992; 139-157.
3. Vahapoğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer pseudomonas türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri 2008; 2175-2186.
4. elik N. oğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
5. Pai H, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 2001; 45: 480-484.
6. Babic M, Huger AM, Bonomo RA. What is new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. ScienceDirect Drug resistance updates 9, 2006; 142-156.
7. Çakar A. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde ayrıtılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, 2005.
8. Gr D. Pseudomonas'lar, Acinetobacter'ler ve Ender Gram Negatif Bakteriler. In: Jawetz, Melnick, Adelberg. Tıbbi Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri. 2010; 263-269.
9. ıragil P. Pseudomonas ve İliőekli Bakteriler. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık. Ankara 2010; 333-341.

10. Tuncer S ve Akova M. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları. *Flora*. 1, 1997; 61-65.
11. Lewinson W, Jawets E. Sindirim Kanalıyla İlgili Gram Negatif Çomaklar. In: Lewinson W, Jawets E. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Barış Kitabevi, İstanbul. 2008; 103-122.
12. Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients, *Indian J. Med. Res.* 2008; 398-402.
13. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Günever E, Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Çalangu S, Günaydın M, Leblebicioğlu H, Esen S, Bayar B, Willke A, Fındık D, Tuncer I, Baysal B, Günseren F, Mamikoğlu L. Surveillance of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45: 695-699.
14. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*. 7, 2002; 135-141.
15. Karahocagil MK, Görkem Y, Göktaş U, Sünnetçioğlu M, Çıkman A, Bilici A, Yapıcı K, Baran Aİ, Binici İ, Akdeniz H. Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi*: 2011; 18: 27-32.
16. Öncül A, Koçulu S, Eevli S. Bir devlet hastanesinin yoğun bakım ünitelerinde kazanılan hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*, 2012; 46: 2.
17. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, Devault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 191-206.
18. Ünlü Söğüt M. Ceftazidim Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 ve OXA-10 benzeri betalaktamazların moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. 2008.

19. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virulans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2008; 38: 42-51.
20. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, İzmir, 2009.
21. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 1681-1688.
22. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1997-2001). J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52: 140-147.
23. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M.. Plazmid encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 1343-1348.
24. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. Clinical Infectious Diseases 1998; 27: 32-41.
25. Louis B Rice MD And Robert A, Bonomo MD. The red menace: Emerging issues in antimicrobial resistance in Gram- negative bacilli. Current Infectious Disease Reports 1999; 1: 338-346.
26. Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K.et all. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between MexABOprM efflux pump and β -lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999; 1301-1303.
27. Livermore MD. Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact. Clinical Infectious Diseases 2003; 36: 11-13.
28. Arman D. Yoğun Bakımda Gram Negatif Bakteri Sorunu. Ankem Derg 2009; 23: 148-156.

29. Wolter D, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol. Letters*, 2004; 236: 137-143.
30. Livermore D. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992; 36: 2046-2048.
31. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 58: 557-584.
32. Bush K, Jacoby GA, Mederios AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; 1995; 39: 1211-1233.
33. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 969-976.
34. Bradford PA. Extended spectrum beta lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 2001; 14: 933-951.
35. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007; 440-458.
36. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 321-331.
37. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
38. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-5413.

39. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europa: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116-119.
40. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. First isolation of *bla*VIM-2 in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-1434.
41. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleakis L S, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5153-5156.
42. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014-2016.
43. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. IMP-12, a New plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522-1528.
44. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach AC, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-679.
45. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Ito H, Arakawa Y. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1960-1967.

46. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 49: 3593-3597.
47. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392.
48. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3008-3011.
49. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999, 43, 1362-1366.
50. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000, 44, 1556-1561.
51. Vahaboğlu H, Hall LM, Mulazımoğlu L, Dodanlı S, Yıldırım I, Livermore DM. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol*. 1995, 43: 294-299.
52. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993, 37: 962-969.
53. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007, 60: 470–482.
54. Zhao W, Hu Z. β -lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010; 36: 245-258.

55. Gülay, Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin Yorumu, *Toraks Dergisi* 2002; 3: 75-88.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, 2012.
57. Walsh T, Bolmström A, Qvarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2755-2759.
58. Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Öztürk C, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi, *ANKEM Derg.*, 2006; 3: 152-155.
59. Fidan I, Gürel F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve Metallo β Laktamaz sıklığı, *Ankem Derg.*, 2005; 19: 68-70.
60. Gültekin B, Eyigör M, Aydın N. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci, *ANKEM Derg.*, 2004; 18: 1-4.
61. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Marova B, Todorova A, Marteva Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanism, *Journal of Medical Microbiology*, 2007; 56: 956-963.
62. Pitout J, Gregson D, Poirel L, McClure J, Le P, Churh D. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43: 3129-3135.
63. Bonfiglio G, Carciotto V, Russo G, Stefani S, Schito G C, Debbia E, Nicoletti G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* an Italian survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41: 307-310.

64. Hamze M, Dabbousi F, Izard D. A 4 year study of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics (1998-2001) in northern Lebanon. *Med Mal Infect.* 2004; 34: 321-401.
65. Özdemir M, Erayman İ, Türk Dağı H, Baykan M, Baysal B. Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2009; 23: 122-126.
66. Aktaş E, Terzi HA, Külah C, Cömert F. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirmesi: Çeşitli antibiyotiklere azalan duyarlılık. *ANKEM Derg.* 2010; 24: 188-192.
67. Öztürk CE, Türkmen Albayrak H, Altınöz A, Ankaralı H. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere direnç ve beta-laktamaz oranları. *ANKEM Derg* 2010; 24: 117-123
68. Livermore D. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 34: 634-640.
69. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini G, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin. Infect. Dis.*, 2000; 31: 1119-1125.
70. Ochs M, McCusker P, Bains M, Hancock R. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; 43: 1085-1090.
71. Bal Ç. Beta-laktamazlar: Güncel durum. *Flora*, 2003; 8: 111-123.
72. Pfaller M, Jones R. MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46: 25-37.

73. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou M, Babini G, Douboyas J, Livermore D. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J. Clin. Microbiol., 2000; 38: 1290-1292.
74. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Legakis N, Maniatis A. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-betalactamase gene variants *blaVIM-2* and *blaVIM-4*. J. Antimicrob. Chemother., 2003; 51: 1409-1414.
75. Patzer J, Toleman M, Deshpande M, Kaminska W, Dzierzanowska D, Bennett P, Jones R, Walsh T. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *blaVIM-4* gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J. Antimicrob. Chemother., 2004; 53: 451-456.
76. Lee K, Lim J, Yum J, Yong D, Chong Y, Kim J, Livermore D. *blaVIM-2* cassette-containing novel integrons in metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean Hospital. Antimicrob. Agents Chemother., 2002; 46: 1053-1058.
77. Lee K, Lee W, Uh Y, Ha G, Cho J, Chong Y. VIM and IMP type metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species in Korean hospitals. Emerg. Infect. Dis., 2003; 9: 868-871.
78. Mendes R, Toleman M, Ribeiro J, Sader H, Jones R, Walsh T. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *blaIMP-16* and a fused form of aminoglycoside resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother., 2004; 48: 4693-4702.
79. Martinez CF, Ruiz BP, Manas MP. Current status of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to antibiotic. Sociedad Espanola de Quimioterapia 2003: 450-452.

80. Araújo Jácome PRL, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2012; 45: 707-712.
81. Anab Fatima A, Naqvi SB, Khaliq SA, Perveen S, Jabeen S. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. *SpringerPlus*, 2012; 1:70.
82. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-banisaeed S, Hossinpour M, Amir-Alvaei S, Araghian A. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2013; 5: 1 36-41.
83. Berktaş M, Çıkman A, Parlak M, Yaman Y, Güdücüoğlu H. Nozokomiyal Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotiklere Direnç. *Van Tıp Dergisi*: 2011; 18: 192-196.
84. Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *ANKEM Derg* 2009; 23: 54-58.
85. Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baylan O, Hoşbul T, Ardiç N, Bektöre B. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg.* 2010; 24: 124-129.
86. Özgenç O, Urbarlı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması, *Infeksiyon Dergisi*, 2002; 6: 179-182.
87. Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A. Occurrence of Beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. *Med. Dosw Microbiol.* 2001; 53: 45–51.

88. Wolska K, Jakubczak A, Soszyńska A. Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL, IBL and MBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains. Med Dosw Mikrobiol. 2008; 60: 111-119.
89. Berktaş M, Güdücüoğlu H, ıkman A, Parlak M, Yaman G. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında İndüklenebilir Beta-Laktamaz Aktivitesi. Fırat Tıp Dergisi 2011; 16: 125-128.
90. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, zer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37: 142-146
91. Çiftci İH, etinkaya Z, Aktepe OC, Arslan F, Altındış M. Klinik rneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005; 35: 98-102.
92. Aktepe OC, Aşık G, etinkaya Z, ifti İH, Altındış M. Klinik rneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40: 225-231.
93. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, Rossolini G, Toniolo A. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2004; 48: 131-135.
94. Partridge S, Brown H, Hall R. Characterization and movement of the Class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. Antimicrob. Agents Chemother., 2002; 46: 1288-1294.
95. Toleman M, Biedenbach D, Bennett D, Jones R, Walsh T. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *blaIMP-13*, harboured by a novel Tn-5051 type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J. Antimicrob. Chemother., 2003; 52: 583-590.

96. Toleman M, Biedenbach D, Bennett D, Jones R, Walsh T. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005; 55: 61-70.
97. Sader H, Castanheira M, Mendes R, Toleman M, Walsh T, Jones R. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial Surveillance Program. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 2005; 25: 57-61.
98. Bozçal E. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının metallo beta-laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
99. Pereria M, Perilli M, Mantengoli E, Luzzaro F, Toniolo A, Rossolini GM, Amicosante G. PER-1 extended-spectrum beta-lactamase production in an *Alcaligenes faecalis* clinical isolate resistant to expended-spectrum cephalosporins and monobactams from a hospital in Northen Italy. *Microb Drug Resist.* 2000; 6: 85-90.
100. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extendedspectrum β -lactamase. *J Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1865-1870.
101. De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, Plaidy A, Boyer M, Carroy E, Gbadamassi MC, Laluque O, Poupart MC, Villemain M, Sirot J. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamase in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 634-639.
102. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, Coskunkan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioğlu H, Balık I, Aydın K, Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2265-2269.

103. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Aklin HE. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 1993; 37: 1637-1644.
104. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2990-2995.
105. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3117-3122.
106. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-15, an extended spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785-790.
107. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs T, Dove MG, Nordmann P. GES-2 a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2598-2603.
108. Xavier DE, Picão R C, Girardello R, Fehlberg L, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology* 2010; 10: 217.
109. Schalk IJ, Guillon L Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. 2013; 44: 1267-1277.
110. Singh DR, Mohammad MM, Patowary S, Stoneman MR, Oliver JA, Movileanu L, Raicu V. Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells. *Integr. Biol.*, 2013; 5: 312-323.

111. Hunter RC, Newman DKA Putative ABC Transporter, HatABCDE, Is among Molecular Determinants of Pyomelanin Production in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Of Bacteriology. 2010; 5962–5971.