



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA  
METALLOBETALAKTAMAZ ÜRETİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Elif VURAL TAŞDEMİR**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU**

**MERSİN-2016**



T.C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA  
METALLOBETALAKTAMAZ ÜRETİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Elif VURAL TAŞDEMİR**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU**

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)**

**( Proje No: 115S799) tarafından desteklenmiştir.**

**MERSİN-2016**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	5
ABSTRACT.....	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	9
2.GENEL BİLGİLER.....	11
2.1. Tarihçe .....	11
2.2. Taksonomi .....	11
2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri .....	12
2.4. Virülans Faktörleri .....	13
2.4.1. Flajella ve piluslar .....	14
2.4.2. Biyofilm sentezi.....	14
2.4.3. Ekzotoksinler ve proteazlar .....	15
2.4.4. Piyosiyanın .....	15
2.4.5. Fosfolipaz C .....	16
2.4.6. Quorum sensing .....	16
2.5. Epidemiyoloji .....	16
2.6.Klinik .....	17
2.6.1. Endokardit.....	17
2.6.2. Solunum sistemi enfeksiyonları .....	17
2.6.3. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları .....	18
2.6.4. Bakteriyemi .....	18
2.6.5. Üriner sistem enfeksiyonları .....	18
2.6.6. Kulak enfeksiyonları .....	18
2.6.7. Kemik ve eklem enfeksiyonları .....	18
2.6.8. Santral sinir sistemi enfeksiyonları .....	19
2.6.9.Göz enfeksiyonları .....	19
2.7. Pseudomonas enfeksiyonlarının tedavisi.....	19
2.8. Antimikrobiyal Direnç.....	20
2.8.1. Aminoglikozid direnci.....	20
2.8.2. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları .....	21
2.8.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları .....	21
2.8.3.1. Penisilin bağlayıcı proteinlerde (PBP) oluşan değişiklikler ile gelişen direnç .....	21
2.8.3.2. Effluks ve dış membran geçirgenliğinin bozulması .....	22
2.8.3.3. Beta-laktamaz enzim salınımına bağlı direnç .....	22

2.8.3.3.1. Grup 1 Kromozomal Beta Laktamazlar.....	24
2.8.3.3.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta Laktamazlar(Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar).....	25
2.8.3.3.2.1. Grup 2a enzimler .....	27
2.8.3.3.2.2. Grup 2b enzimler .....	27
2.8.3.3.2.3. Grup 2be enzimler .....	27
2.8.3.3.2.4. Grup 2br enzimleri .....	28
2.8.3.3.2.5. Grup 2c enzimleri.....	28
2.8.3.3.2.6. Grup 2d enzimleri .....	28
2.8.3.3.2.7. Grup 2e enzimleri .....	28
2.8.3.3.2.8. Grup 2f enzimleri .....	28
2.8.3.3.3. Grup 3 Beta Laktamazlar (Metallo-β-Laktamazlar) .....	29
2.8.3.3.4. Metallo Beta Laktamazların Laboratuvar Tanısı .....	30
2.8.3.3.4.1. Modifiye Hodge Testi.....	31
2.8.3.3.4.2. Çift disk sinerji testleri.....	31
2.8.3.3.4.3. Kombine disk diffüzyon testi.....	32
2.8.3.3.4.4. E test yöntemi.....	32
2.8.3.3.4.5. Moleküler Testler .....	32
3. GEREÇ-YÖNTEM.....	34
3.1.Çalışma Grubu .....	34
3.2. Araç ve gereçler .....	36
3.2.1. Kullanılan kitler ve kimyasallar .....	38
3.2.2. Kullanılan besiyerleri .....	38
3.2.3. Çözeltiler.....	39
3.2.3.1. EDTA (0.5 M pH: 8.0).....	39
3.2.3.2. TE Tamponu .....	39
3.2.3.3. dNTP Karışımı .....	39
3.2.3.4. Primer Karışımı.....	40
3.2.3.5. TBE Tamponu (5x).....	40
3.2.3.6. Etidyum Bromür .....	40
3.3. Yöntem .....	40
3.3.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirmesi .....	40
3.3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	40
3.3.1.2. Metallobetalaktamazların Fenotipik Olarak Tanımlanması.....	41
3.3.1.2.1. İmipenem/İmipenem-EDTA Kombine Disk Testi.....	41

3.3.1.2.2. E-test yöntemi .....	42
3.3.1.3. Metallo Beta Laktamazların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması .....	42
3.3.1.3.1. DNA İzolasyonu .....	42
3.3.1.3.2. Metallo Beta Laktamaz Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler .....	43
3.3.1.3.3. Reaksiyon İçeriğinin Hazırlanması .....	44
3.3.1.3.4. Genlerin Amplifikasyonu .....	45
3.3.1.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	45
3.3.1.4. DNA Dizi Analizi .....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı.....	46
4.2. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı .....	46
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları .....	47
4.3.1. Disk diffüzyon ve otomatize sistem ile antibiyotik duyarlılıklarının saptanması .....	47
4.3.2. Gradyent test(E-test) ile MİK değerlerinin belirlenmesi.....	53
4.4. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Fenotipik Testler ile Araştırılması.....	56
4.4.1. Fenotipik Testlerin Karşılaştırılması .....	59
4.5. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması.....	59
4.5.1. VIM-1 Geninin PZR ile Araştırılması.....	59
4.5.2. GIM Geninin PZR ile Araştırılması .....	61
4.5.3. IMP-1, IMP-2, SPM, OXA-23, OXA-24 Genlerinin PZR ile Araştırılması ...	61
4.6. Dizi Analizi Verilerinin değerlendirilmesi .....	61
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAKLAR DİZİNİ .....	73
8. SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	84
9. ŞEKİLLER DİZİNİ .....	86
10. TABLOLAR DİZİNİ .....	87

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım; Prof. Dr. Nuran Delialioğlu'na, uzmanlık eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Gönül Aslan'a, Prof.Dr. Candan Öztürk'e, Prof.Dr.Zehra Feza Otağ'a, Doğ.Dr.Seda Tezcan Ülger'e, emekli öğretim üyelerimizden Prof.Dr.Gürol Emekdaő'a, tezimin hazırlanma aőamasında çok büyük desteğini gördüğüm ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Mehmet Sami Serin'e, tüm çalışma arkadaşlarıma, desteğiyle hep yanımda olan eőim Ali, kızım Nil ve aileme teőekkür ederim.



## ÖZET

*Pseudomonas aeruginosa* sıklıkla hastane enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı patojendir. Son yıllarda karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonları artmakta ve tedavide sorunlar yaşanmaktadır. Karbapenem direnç mekanizmaları OprD porin proteini kaybı, effluks sistemi ile ilacın dışarı atılımı ve AmpC betalaktamaz ve metallobetalaktamaz(MBL) üretimidir. Bu çalışmada; karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya karbapenemlere dirençli/orta duyarlı 58 *P. aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. Antibiyotik duyarlılıkları disk diffüzyon ve otomatize sistem kullanılarak yapılmıştır. Karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla imipenem(IMP), meropenem(MEM), doripenem gradiyent test yapılmıştır. MBL varlığını araştırmak için fenotipik testlerden kombine disk testi(KDT) ve MBL E-test uygulanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile en sık rastlanan MBL genlerinden IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, SPM, GIM ve sınıf D betalaktamazlardan OXA-23 ve OXA-24'ün varlığı araştırılmıştır. Gen bölgesi pozitif bulunan örnekler dizi analizi uygulanmıştır.

İzolatların otomatize sistemle 57'si imipeneme, 43'ü meropeneme dirençli, 1'i imipenem, 15'i meropenem orta duyarlı bulunmuştur. E test ile imipenem direnci aynı ancak meropeneme 34 suş dirençli diğerleri orta/duyarlı bulunmuştur. İzolatların KDT ile 37 (% 63.7)'sinde, MBL E-test ile 16 (% 27) sında MBL pozitif olarak saptanmıştır. PZR ile 8 izolatta (%13.7) MBL gen bölgesi tespit edilmiştir. Bunlardan 6 izolatta VIM-1, 2 izolatta ise GIM gen bölgesi pozitif bulunmuştur. DNA dizi analizi ile gen bölgelerinin doğrulanması yapılmıştır. MBL tespitinde kullanılan fenotipik testler ile PZR yöntemi ile karşılaştırıldığında KDT'nin duyarlılığı % 87.5, özgüllüğü % 40, MBL E-testin duyarlılığı % 87.5, özgüllüğü % 82 ( $p=0.0001>$ ,  $r=0.536$ ) olarak bulunmuştur.

Karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında MBL aktivitesinin tespitinde E testin duyarlılığı ve özgüllüğü KDT'ye göre yüksek bulunmuştur. Türkiye'de yapılan çalışmalarla uyumlu olarak en sık VIM gen bölgesi tespit edilmiştir. MBL negatif izolatlarda ise karbapenem direncinden porin kaybı ve

effluks pompası gibi diđer mekanizmaların sorumlu olduđu dűşűnűlmektedir. MBL oluřturan izolatların hızlı tespiti ve uygun enfeksiyon kontrol ۆnlemlerinin alınması dirençli mikroorganizmaların yayılmasını ۆnlemek için gereklidir.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenem direnci, metallobetalaktamaz





## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that frequently cause hospital infections. In recent years, it is hard to treat due to carbapenem resistant *P.aeruginosa* infections. Carbapenem resistance mechanisms involve OprD porin loss, overexpression of efflux systems, overproduction of AmpC-type  $\beta$ -lactamase and metallo $\beta$ -lactamase. The aim of this study is investigating the presence of metallo $\beta$ -lactamase (MBL) enzymes and genes in carbapenem resistant *P. aeruginosa* clinical isolates.

58 *P. aeruginosa* isolates that were intermediate resistant/resistant to carbapenems have been collected in 2015 in our hospital were included in the study. Bacterial colonies suspected to *Pseudomonas* identified by using automated systems. The susceptibility pattern of isolates to different antibiotics were examined using disk diffusion method (Kirby-Bauer) and automated systems. Strains were tested against imipenem, meropenem and doripenem by gradient test to confirm carbapenem resistance. The imipenem-EDTA combination disk (CDT) and metallo $\beta$ -lactamase E-test (MBL E-Test) phenotypic tests were performed for detection of MBL producing strains. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect most frequent MBL genes IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, SPM, GIM and Clas\_D  $\beta$ -lactamase genes OXA-23, OXA-24. DNA sequence analysis was performed to PCR positive isolates.

Of 58 isolates, were 57 (99%) resistant to imipenem, one was intermediate resistant, were 43 (74%) meropenem resistant and 15 (25%) intermediate resistant. Carbapenem resistance was confirmed by gradient test(E-test). Of 58 isolates, were positive 37 (63%) with imipenem/imipenem-EDTA combined disk test (CDT), 16 (27%) with MBL E-test and 8(13.7%) with PCR. 8 isolates were VIM-1 positive and 2 isolates were GIM positive. The sequencing of the PCR products confirmed the presence of MBL genes.

For the determination of MBL activity, sensitivity and specificity of MBL E-test is higher than CDT. Consistent with studies in Turkey VIM genes have been identified the most frequently. In MBL negative isolates carbapenem resistance is thought to be responsible for other mechanisms like efflux pump and porin

loss. Rapid detection of strains producing MBL and advent of effective infection control measures is required to prevent the spread of resistant microorganisms.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem resistance, metalloβ-lactamase



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) insanların normal floralarında, örneğin deride (%0-2), dışkıda(2,6-24), burun mukozasında(0-3,3) bulunabilir. Hastaneye yatan özellikle yanıklı hastaların derilerinde, mekanik ventilatöre bağlı hastaların solunum cihazlarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sistemlerinde taşıyıcılık oranı artabilir<sup>1,2</sup>.

Birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olan *P. aeruginosa*, yüksek oranda kazanılmış direnç geliştirebilme yeteneğine de sahiptir. Hayatı tehdit eden ve tedavisi güç olan hastane enfeksiyonu (HE) etkenleri arasında sıklıkla yer almaktadır. Yanık ünitelerinde, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ), mekanik ventilatörlerde, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan ünitelerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invaziv enfeksiyonlara da yatkınlık oluşturmaktadır<sup>3</sup>.

*P. aeruginosa* insanda birçok hastalığa neden olmaktadır. Alt solunum yollarında asemptomatik kolonizasyondan veya trakeobronşitten, ciddi nekrotizan bronkopnömoniye kadar değişen hastalıklara neden olabilir. Çeşitli birincil deri enfeksiyonlarına neden olur. En iyi tanımlanan enfeksiyon, yanık yaralarıdır. Üriner sistem enfeksiyonu, eksternal otit, bakteriyemi, endokardit neden olduğu diğer hastalıklardandır<sup>3</sup>.

Hastane enfeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere karşı geliştirdiği çoklu direnç, dünya genelinde önemli bir sorun oluşturmuştur. Son yıllarda karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* suşlarıyla meydana gelen enfeksiyonların sıklığında önemli bir artış ve tedavilerinde önemli sorunlar yaşanmaktadır<sup>4</sup>.

*P. aeruginosa*'da karbapenem direnç mekanizmaları beta laktamaz salınımı, efflux pompası ve impermeabilitedir. Karbapenem direnci en sık Opr D2 kaybına bağlı impermeabilite, IMP, VIM, SPM, GIM artışına bağlı karbapenem hidrolize edici metallobeta laktamaz salınımı ile gelişmektedir<sup>5</sup>.

Türkiye'de *P. aeruginosa* izolatında ilk MBL 2003 yılında saptanmış ve VIM-5 olduğu bildirilmiştir<sup>6</sup>. Ülkemizde metallobeta laktamaz varlığının araştırılmasında kullanılan fenotipik testler ile ilgili çalışmalar mevcuttur<sup>7,8</sup>.

Bununla birlikte MBL üreten *P. aeruginosa* sıklığı ve MBL tiplerinin dağılımı ile ilgili moleküler veriler oldukça kısıtlıdır.

Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL sıklığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

*Pseudomonas aeruginosa* kültürü esnasında oluşturduğu mavi-yeşil renk nedeniyle tarih boyunca çeşitli isimler almıştır. 1850 yılında Sedillot askerlerin yaralarının pansumanı sırasında mavi renk oluşturan ve hastadan hastaya aktarılabilen bir ajan olduğunu fark etmiştir. Mavi renk oluşumundan sorumlu pigment 1860 yılında Fordos tarafından ekstrakte edilebilmiş, 1862 yılında Lucke pigmenti çomak şekilli mikroorganizmalarla ilişkilendirilmiştir.1882 yılında Carle Gessard'ın yayınladığı "Bandajlar üzerinde mavi-yeşil renk oluşturan irin" adlı raporda, iki hastanın yarasındaki irinden izole edildiği belirtilmiş ve sonrasında "*Bacillus pyocyaneus*" olarak isimlendirilmiştir<sup>9</sup>. 19.yy'ın sonlarında Migula tarafından *Pseudomonas* tanımı cins adı olarak; *Pseudomonas pyocyanea* tanımı ise tür adı olarak kullanmıştır<sup>10</sup>.

### 2.2. Taksonomi

*Pseudomonas*'lar aerobik, Gram negatif, hareketli ve pigmentler oluşturan basillerdir. Bitkilerde, toprakta, suda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunur<sup>11</sup>.

*Pseudomonas*'ların sınıflandırması pigment oluşturup oluşturmamalarına, görünümüne ve metabolizmalarına göre yapılmıştır. Son zamanlarda RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre bu bakteriler rRNA gruplarına ayrılmışlardır<sup>12</sup>.

**Tablo 1. Klinik önemi olan *Pseudomonas*'ların sınıflandırması<sup>11,13</sup>**

rRNA Grup I		Tür
<i>Pseudomonas</i>	Floresan grup	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		<i>Pseudomonas putida</i>

	<b>Stutzeri grup</b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
		<i>Pseudomonas mendocina</i>
		CDC grup Vb-3
	<b>Alcaligenes grup</b>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
		<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
		<i>Pseudomonas sp. grup 1</i>
	<b>Sarı pigment oluşturan grup</b>	<i>Pseudomonas luteola</i>
		<i>Pseudomonas oryzae</i>

### 2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

*Pseudomonas* türleri sporsuz, aerob, düz veya hafif kıvrımlı, 0.5-1.0 µm ve 1.5–5.0 µm boyutlarında Gram-negatif çomaklardır. Polar flajellaları ile genellikle hareketlidirler<sup>3</sup>.

Piyosiyanin adı verilen çözüner fenazin pigmenti üretmesi önemli özelliklerinden biridir. Piyosiyanin dışında bakteri siyah pigmentten sorumlu piyomelanin, kırmızı pigmentten sorumlu piyorubin, veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti oluşturabilirler. Koyun Kanlı Agar, Triptik Soy Agar, Çukolata Agar, Mueller Hinton Agar (MHA), Eozin Metilen Blue Agar ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği ise tür ayrımında önemlidir. *P. aeruginosa* glikozu fermente etmemesi ve oksidaz pozitif olması ile *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerinden ayrılır. Laktoz ve sakkaroz etkisizdir. İndol ve H<sub>2</sub>S oluşturmaz, katalaz ve L-arginin dihidrolaz oluşturur. Voges-Proskauer ve Metil kırmızısı reaksiyonları negatiftir; potasyum siyanüre dirençlidir<sup>14,1</sup>.

*P. luteola* ve *P. oryzae* dışında oksidaz pozitifler<sup>12,15</sup>.

**Tablo 2. *Pseudomonas* türlerinin laboratuvar identifikasyon özellikleri<sup>1</sup>**

Test	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens/ P.putida</i>	<i>P.stutzeri</i>
Oksidaz	+	+	+
Piyosiyanin	+/-	-	-

42°Cde üreme	+	-	+
Üreaz	+	-/+	-/+
Nitrattan gaz oluşturma	+/-	-	+
Floressein	+	-/+	-
Glukoz	+	+	+
Maltoz	-	-	+/-
Kirpik	1	>1	1
Hareket	+	+	+

(+: suşların % 85'den fazlası pozitif , +/-: suşların % 50-85'i pozitif )

(-: suşların % 85'den fazlası negatif , +/-: suşların % 50-85'i negatif)

#### 2.4. Virülans Faktörleri

*P. aeruginosa* fırsatçı patojen olarak kabul edilir ve hastalık oluşturmada çeşitli yapıları ve hücre dışı enzimleri etkilidir<sup>1</sup>.

**Tablo 3. *P. aeruginosa* Virulans Faktörleri<sup>1</sup>**

Virülans faktörü	Rolü	Kontrolü
Piluslar-nonpilus adezinler	Dokuya yerleşme	Nitrojen düzeyi
Nöraminidaz	Piluslarla tutunmayı kolaylaştırır.	Osmolarite
Ekzozim S	Konak hücre G proteinlerini etkiler ve fagositozu engeller.	Isı ve oksijen düzeyi
Ekzotoksin A	EF2'yi etkileyerek doku hasarı yapar, fagostozu engeller.	Demir

Elastaz	Damarları ve akciğeri hasarlandırır ve immün kompleks depolanmasından sorumludur.	Bakteri yoğunluğu?
Proteazlar	Akciğer ve diğer dokularda hasar oluşturur.	Bilinmiyor.
Slime tabakası(Alginat sentezi)	Tutunma ve fagositozun engellenmesi, antibiyotik direnci.	Osmolarite ve nitrojen düzeyi
Lipopolisakkarit	Septik şok, antibiyotik direnci	
Antibiyotik direnci	Tedavi etkinliğinin engellenmesi	Bilinmiyor.

#### 2.4.1. Flajella ve piluslar

Flajella *P. aeruginosa*'nın hareketini, pilus ise mukozal yüzeylere yapışmayı sağlar<sup>3</sup>. Flagellalar solunum yolu epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-gangliozid-M1(aGM1)' e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar<sup>16</sup>.

Pililerin sitotoksitede etkisi olduğu görülmüştür. *Neisseria gonorrhoeae*'nin piluslarına benzeyen Tip 4 pilus, temel pili türüdür. Bakterinin solid yüzeylere tutunmasından, bakteriyofajların bağlanmasından ve girişinden sorumludur. Pila protein subünitlerinden oluşan Tip4 pili, akciğer pnömositlerine(A549) tutunabilme kabiliyetinden büyük oranda sorumludur. Tüm *P. aeruginosa* pilinleri C-terminal ucunda 12-17 aminoasitten oluşan, epitelyal hücrelere bağlanmayı sağlayan disülfid bağı(DSL) içerirler<sup>17</sup>.

#### 2.4.2. Biyofilm sentezi



Biyofilm oluşumu, özellikle kateter ilişkili hastane enfeksiyonları açısından önemli bir virülans faktörüdür. Özellikle kistik fibrozis hastalarında kalın bir biyofilm tabakasının oluşumu, etkeni immun sistemden korumakta, kolonizasyon eradikasyonunu zorlaştırmaktadır.

Biyofilm oluşumu ekstraselüler polimerik aljinat üretimi ile gerçekleşmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında aljinat sentezi *algACD* geni ile kontrol edilmektedir. Ayrıca, kistik fibrozis hastalarından izole edilen mukoid suşlarla mukoid olmayan suşlar karşılaştırıldığında, mukoid suşların daha fazla miktarda aljinat içerdiği gözlemlenmiştir<sup>18</sup>.

### 2.4.3. Ekzotoksinler ve proteazlar

*P. aeruginosa*'nın ürettiği ekzoenzimler içinde en toksik olanı ekzotoksin A (ETA)'dır ve ökaryotik hücrede elongasyon faktör 2'yi (EF-2'yi) inhibe ederek protein sentezini engellemektedir<sup>19</sup>.

Ayrıca Tip III sekresyon sistemi(TTSS) olarak bilinen bir virülans faktörü de mevcuttur. TTSS, *P. aeruginosa*'nın toksinlerinin ökaryotik hücre sitozolüne enjeksiyonunu sağlamaktadır. TTSS toksini olan ExoU'nun akut akciğer hasarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. ExoU geni pozitif olan *P. aeruginosa* izolatları ile gelişen enfeksiyonların kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır<sup>20</sup>.

Elastaz, ekstraselüler matriks proteinleri olan kollajen, fibrinojen, elastin ve opsonin reseptörlerinin yıkımına ve böylece etkenin akciğer parankim hücrelerine girişine neden olur. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oluşan ektima gangrenozum ile ilişkili olduğu görülmüştür. Alkalın proteaz(AprA) ise TNF alfa ve komplemanı inhibe ederek bakterinin öldürülmesini engellemektedir<sup>21</sup>.

### 2.4.4. Piyosiyenin

*Pseudomonas* türleri tarafından üretilen pigmentler piyosiyenin(mavi-yeşil renkten sorumlu, piyoverdin(sarı-floresan), piyomelanin(açık kahverengi), piyorubin(kırmızı-kahverengi) olarak bilinmektedir. Piyosiyenin *Pseudomonas* türlerinin karakteristik mavi-yeşil renginden sorumludur. Hücre yaşlanmasına,

siliyer diskineziye, IL-8 artışına ve Ca<sup>+</sup> dengesinin bozulmasına neden olan bir redoks aktif fenazin bileşimidir. Kistik fibrozis hastalarında  $\alpha$ 1-antitripsini inaktive ederek proteaz-antiproteaz dengesinin bozulmasına yol açar. Demirin transferrinden serbestleşmesini sağlayan redüksiyon sisteminin bir parçası olup demir metabolizmasında önemli yer tutmaktadır. Biyofilm oluşumu, gen ekspresyonu gibi önemli biyolojik etkileri olan piyosiyenin, Quorum sensing sinyal molekülüdür<sup>22</sup>.

Anti-bakteriyel etkisinin ise, piyosiyenin bakteri hücre membranı ile etkileşimi sonucu aktif transport sistemini inhibe etmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir<sup>23</sup>.

#### 2.4.5. Fosfolipaz C

*P. aeruginosa* iki hemolizin oluşturur. Bunlar ısıya duyarlı fosfolipaz C ve ısıya dayanıklı ramnolipiddir. Sinerjistik etki ile lipidleri ve lesitini parçalar, doku invazyonuna katkıda bulunurlar. Fakat bu etkilerini konak dokusuna sitotoksik etkileri ile yapar<sup>24</sup>.

#### 2.4.6. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) sistemi, bir bakteri tarafından üretilen çevredeki diğer mikroorganizmalar tarafından algılanabilen küçük sinyal moleküllerinden oluşmaktadır<sup>25</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans genlerinin ekspresyonunda anahtar rol oynamaktadır. *P. aeruginosa*'da açıl homoserin laktonlardan oluşan bu moleküllerin *las* ve *rhl* sistemi kontrolünde olduğu bilinmektedir. Elastaz, alkalin proteaz, ekzotoksin A, biyofilm oluşumu, piyosiyenin salgılanması gibi *P. aeruginosa*'nın ürettiği pek çok virülans faktörünün QS sistemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>26</sup>.

### 2.5. Epidemiyoloji

*Pseudomonas* türleri, değişik besin kaynaklarını kullanabilmeleri ve geniş sıcaklık aralığında üreyebilmeleri nedeniyle doğada yaygın olarak bulunmaktadır<sup>26</sup>. Havadan, sudan, hayvan ve bitkilerden izole edilebilirler. Üremesi için çok az besine ihtiyaç duyar. Distile su içinde dahi üreyebilir. *Pseudomonas* türleri nemli ortamı sever. İnsanlarda koltuk altı, perine, kulak gibi nemli bölgelerde bulunur. Temizlik solüsyonları, solunum cihazları, dezenfektanlar, paspaslar gibi *P. aeruginosa* rezervuarlarında nemlilik önemli bir faktördür. *P. aeruginosa* insanların normal floralarında, örneğin deride (%0-2), dışkıda(2,6-24), burun mukozasında(0-3,3) bulunabilir. Hastaneye yatan özellikle yanıklı hastaların derilerinde, mekanik ventilatöre bağlı hastaların solunum cihazlarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sistemlerinde taşıyıcılık oranı artabilir<sup>1,2</sup>.

## **2.6.Klinik**

Fırsatçı patojen olarak bilinen *P. aeruginosa* insanlarda birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar şunlardır:

### **2.6.1. Endokardit**

*P. aeruginosa* protez kapak endokarditine sebep olmaktadır. Aynı zamanda intravenöz ilaç bağımlılarında doğal kalp kapaklarını da enfekte edebilir. Bunlarda triküsbit kapak tutulumu daha sıktır<sup>24</sup>.

### **2.6.2. Solunum sistemi enfeksiyonları**

*P. aeruginosa* ile alt solunum yolu enfeksiyonları daha çok konak savunmasında defekt olduğu durumlarda görülür. Kistik fibrozis hastalarında kronik solunum yolu enfeksiyonları meydana gelmektedir. Bunun nedeninin, bu hastalarda opsonizasyon, fagositoz ve bakterisit mekanizmaların yetersizliği olduğu bilinmektedir<sup>1</sup>.

### **2.6.3. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları**

Birincil deri enfeksiyonlarına neden olan *P. aeruginosa* ile ilişkili en iyi tanımlanan enfeksiyon yanık yaralarıdır. Ciddi yanık hastalarında yaranın *P. aeruginosa* ile kolonizasyonunun, genellikle lokalize damar hasarı, doku nekrozu ve sonrasında bakteriyemi ile sonuçlandığı bilinmektedir<sup>2</sup>.

### **2.6.4. Bakteriyemi**

*P. aeruginosa* bakteriyemisinde primer enfeksiyon bölgeleri gastrointestinal ve üriner sistem, deri ve yumuşak dokulardır. *P. aeruginosa* bakteriyemisinde tipik deri lezyonu olan ektima gangrenosumun bulunması değerlidir<sup>1</sup>.

### **2.6.5. Üriner sistem enfeksiyonları**

*Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları genellikle hastane kökenli olup uzun süreli üriner sistem kateterizasyonu ile ilişkilidir. Hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarında *E. coli* ve enterokoklardan sonra üçüncü sıklıktadır<sup>1,2</sup>.

### **2.6.6. Kulak enfeksiyonları**

*P. aeruginosa* normal kulakta nadiren bulunmakla birlikte yaralanma, maserasyon, inflamasyon ve nem varlığında dış kulak yolunda sıklıkla yerleşir. Eksternal otit gibi yüzme ile ilişkili kendini sınırlayıcı enfeksiyonların yanı sıra malign eksternal otit gibi kronik ciddi enfeksiyonlara da neden olabilir<sup>24</sup>.

### **2.6.7. Kemik ve eklem enfeksiyonları**

Penetran yaralanmalar sonucu olabileceği gibi diabetik hastalar veya intravenöz ilaç kullananlarda hematogen yayılım sonucu meydana gelebilir ve kronik osteomyelit ile sonuçlanabilmektedir. Delici travma, cerrahi sonrası ve

yumuşak doku enfeksiyonları sonucunda da kemik ve eklem enfeksiyonları gelişmektedir.<sup>24,1</sup>.

### **2.6.8. Santral sinir sistemi enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*, santral sinir sistemine sinuzit veya malign eksternal otit gibi lokal bir odaktan, direkt kafa travmaları ve cerrahi sonrası direkt inokulasyon ile ya da endokardit gibi enfeksiyon varlığında hematogen yol ile ulaşabilir. Menenjit veya beyin apsesine neden olabilir<sup>24</sup>.

### **2.6.9. Göz enfeksiyonları**

Korneal ülser, bakteriyel keratit ve endoftalmite neden olan *P. aeruginosa*, kornea için en önemli patojen olup 24-48 saat içinde keratit oluşturmaktadır<sup>24</sup>.

### **2.7. Pseudomonas enfeksiyonlarının tedavisi**

*Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisi zordur. Bunun nedenleri bakterinin bir çok antibiyotiğe dirençli olması ve enfekte hastaların baskılanmış immün sisteminin antibiyotiklerin etkinliğini azaltmasıdır<sup>2</sup>.

*P. aeruginosa* bir çok antibakteriyel ajana direnç geliştirebilir, bu nedenle enfeksiyonlarının tedavisi güçtür. Penisilinler (mezlosilin, azlosilin, tikarsilin, piperasilin), üçüncü kuşak sefalosporinler (sefaperozon, seftazidim), karbapenemler (imipenem, meropenem), aminoglikozidler (amikasin, gentamisin), monobaktamlar (aztreonam), florokinolonlar (siprofloksasin), polimiksinler (polimiksin B ve kolistin) *Pseudomonas* türlerine etkili antibiyotiklerdir. Tedavide aminoglikozidlerin beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilmesi önerilmektedir<sup>19</sup>.

Son yıllarda artan antibiyotik direnci, tedavi seçeneklerini kısıtlaması nedeniyle önemli bir sorun haline gelmiş, ampirik tedavi seçiminde zorluklara

neden olmuştur. Seftalozon-tazobaktam, seftazidim-avibaktam ampirik tedavide kullanılabilen ajanlardır<sup>28</sup>.

## 2.8. Antimikrobiyal Direnç

Son yıllarda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* ilişkili nozokomiyal enfeksiyonlarda artış görülmektedir<sup>28</sup>. Etkenin birçok antimikrobiyale doğal dirençli oluşu, antimikrobiyal direnç mekanizmalarının çokluğu bu enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir<sup>30</sup>.

EARSS(Avrupa Antimikrobiyal Direnç Ağı Sürveyans Sistemi) 2013 verilerine göre, *P.aeruginosa*'da karbapenem direnç oranı ortalama % 17.6 olarak bulunmuştur<sup>31</sup>.

Ülkemizde yapılan üç yıllık sonuçların değerlendirildiği bir çalışmada ise, *P. aeruginosa* izolatlarının % 29'unun piperasilin tazobaktama, % 34'ünün sefaperazon-sulbaktama, % 34'ünün seftazidime, % 31'inin sefepime, % 22'sinin imipeneme, % 21'inin meropeneme, % 20'sinin amikasine dirençli olduğu saptanmıştır<sup>32</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa*'nın kullandığı direnç mekanizmaları ise, hücre duvarı geçirgenliğinin azalması (intrensek direnç sağlar), kromozomal veya plazmid aracılı ekstraselüler enzimlerin üretimi (beta laktamazlar, sefalosporinazlar, aminoglikozidazlar), antibiyotik bağlayan protein bölgelerinde değişiklik, efflüks sistemi ile antibiyotiğin hücreden dışarı pompalanması şeklindedir<sup>9</sup>.

### 2.8.1. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozid mofiyeden enzimler (AME) plazmidlerce kodlanmaktadır. Antibiyotik molekülüne fosfat, adenil veya asetil gruplarından birini ekleyerek antibiyotiğin 30S ribozomal ünitesine affinitesini azaltmaktadırlar<sup>33</sup>.

AME'ler plazmid kontrolünde üretilirler ve üç gruba ayrılırlar; aminoglikozid fosforil transferazlar, aminoglikozid adeniltransferazlar (nükleotidil transferazlar; AAD, ANT) ve aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC). ACC(6')-II'nin gentamisin, tobramisin ve netilmisin, ACC(3)-I'in gentamisin, AAC(3)-II'nin

gentamisin, tobramisin ve netilmisin, AAC(6')-I'in tobramisin, netilmisin ve amikasin, ANT(2')-I'in ise gentamisin ve tobramisin direncinden sorumlu olduğu bilinmektedir<sup>30</sup>.

### 2.8.2. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları

*P. aeruginosa*'da florokinolon direnci iki mekanizma ile gerçekleşir. İlk mekanizma enzimler üzerindeki yapısal değişikliklerdir. DNA giraz (Topoizomeraz II) enzimidaki aktif bölgeyi kodlayan *gyrA/gyrB* genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda enzimin A ve B subünitlerinin aminoasit dizilimleri değişmekte, enzimin kinolonlara olan affinitesi azalmaktadır<sup>34</sup>.

İkinci önemli mekanizma aktif effluks pompa sistemi ile gelişen dirençtir. MexV(membran füzyon proteini), Mex-W, Opr-M pompa sistemlerinin florokinolonların yanı sıra tetrasiklinler, kloramfenikol ve eritromisin direnci ile ilişkili olduğu belirtilmektedir<sup>30</sup>.

### 2.8.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

*Pseudomonas* türlerinde beta laktam antibiyotiklere direnç üç yolla gerçekleşmektedir:

1. PBP lerde oluşan değişiklikler nedeni ile antibiyotiğin hedefine bağlanamaması,
2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması ve effluks,
3. Betalaktamaz salınımı ile ilacın inaktivasyonu<sup>9</sup>.

#### 2.8.3.1. Penisilin bağlayıcı proteinlerde (PBP) oluşan değişiklikler ile gelişen direnç

*P. aeruginosa*'da Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik nadiren beta laktam direncine sebep olmaktadır. *P. aeruginosa*'da bulunan PBP-4'te gerçekleşen mutasyonların beta-laktam direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır<sup>35</sup>.

### 2.8.3.2. Efflüks ve dış membran geçirgenliğinin bozulması

*Pseudomonas aeruginosa*'da beta laktam direncinde rol alan nonenzimatik nedenlerden biri efflüks sistemidir. Tüm antipsödomonal antibiyotiklere çoklu dirençten sorumludur. Üç komponentten oluşan ve genetik olarak farklı dört efflüks sistemi rol almaktadır. Bunlar: MexA–MexB–OprM, MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN ve MexX–MexY–OprM'dir<sup>36,9</sup>.

MexB, MexD, MexF ve MexY proteinleri sitoplazmik membranda yer almaktadır. Enerji bağımlı olarak çalışan bu pompa geniş bir substrat profiline sahiptir. İkinci komponenti; OprM, OprJ, OprN ve OprM dış membran proteinlerinden oluşmaktadır. Üçüncüsü komponent ise periplazmik aralıkta bulunan MexA, MexC, MexE ve MexX proteinlerinden meydana gelmektedir ve diğer iki sistemi birbirine bağlamaktadır<sup>30</sup>.

Tüm Gram negatif basiller için geçerli olmakla birlikte, özellikle *P. aeruginosa* ve diğer nonfermentatif basillerde porin kaybı beta-laktam duyarlılığında azalmaya yol açması açısından önem taşımaktadır. Çünkü *P. aeruginosa* gibi türlerin dış membran geçirgenliği diğer Gram negatif basillere göre daha azdır ve bu nedenle değişimlerden daha kolay etkilenmektedir<sup>37</sup>.

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarında OprD porin proteini kaybı sonucu imipeneme direnç gelişirken meropeneme duyarlılıkta azalma görülmektedir. Bu durum meropenemin farklı kanallardan dış membranı geçebildiğini düşündürmektedir. Sadece kromozomal AmpC tipi betalaktamaz üreten suşlarda OprD porin proteini kaybına bağlı olarak karbapenem direnci gelişimi gözlenmekte olup, bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki olabileceğini düşündürmektedir<sup>30,9</sup>.

### 2.8.3.3. Beta-laktamaz enzim salınımına bağlı direnç

Beta-laktam antibiyotiklerdeki dört üyeli beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimler beta laktamaz enzimleri olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak penisilinleri hidroliz etmeleriyle tanımlanan beta laktamazlara, her yeni beta-laktam grubu antibiyotik kullanılmasıyla yenileri eklenmiştir. Abraham ve Chain'nin 1940 yılında



penisilinazı ortaya koymalarından bu yana 890'a yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır<sup>38</sup>.

Ambler tarafından 1980 yılında yapılan beta-laktamaz enzimlerinin moleküler sınıflandırması, nükleotid ve aminoasit dizilimlerine göre yapılmış, A'dan D'ye dört sınıfı içeren kolay anlaşılır bir sınıflandırmadır. A, C ve D sınıfı enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulunurken, B sınıfı enzimler aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinim duyarlar<sup>39,40</sup>.

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan ve öncelikle penisilinleri hidrolize eden beta-laktamazlardır. Gram-negatif bakterilerde bulunan TEM-1 enzimi bu gruba iyi bir örnektir.

Sınıf B: Aktive gösterebilmeleri için çinko iyonu gerektiren metalloenzimlerdir.

Sınıf C: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan ve öncelikle sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan enzimlerdir.

Sınıf D: Oksasilini hidrolize eden serin beta-laktamazlardır.

1995 yılında ise Bush, Jacoby ve Mederios betalaktamazları, biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre 4 grupta sınıflandırmışlardır. Bu grupların genel özellikleri Tablo 4 de görülmektedir.

**Tablo 4. Beta-laktamazların sınıflandırılması<sup>41</sup>**

Fonksiyonel Mekanizma	Ambler (sınıf)	Bush (grup)	Örnekler	Substratlar
Serin betalaktamazlar	Sınıf A penisilinazlar	(2a, 2b, 2c)	Geniş spektrumlu betalaktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzilpenisilin, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler (sefazolin, sefuroksim)
		(2be)	Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL): TEM ailesi ve SHV ailesi Diğerleri: BES1, GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO1, TLA-1, VEB-1/2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin oksasilin TEM ve SHV ailesi ile aynı
		(2br)	TEM ailesi (TEM-30, TEM-31)	TEM ve SHV ailesi ile aynı ve inhibitörlere dirençli
		(2e)	CTX ailesi	Geniş spektrumlu betalaktamazlar ile aynı,

				bazı enzimler için sefepim
		(2f)	Karbapenemazlar (KPC1,KPC-2,KPC-3 ve GES-1, GES-2)	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten karbapenemler, sefamisinler
Metallobetalaktamazlar	Sınıf B metallobetalaktamaz (Çinko)	(3a, 3b, 3c)	Karbapenemazlar: IMPailesi, VIM ailesi, SPM-1,SPM-2, GIM-1 ve L-1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A ile Aynı
Serin betalaktamazlar	Sınıf C sefalosporinaz	(1)	AmpC tip: AAC-1, ACT-1,CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten sefamisinler
Serin betalaktamazlar	Sınıf D kloksasilin hidrolize edici enzimler (OXA)	(2d)	OXA ailesinin çoğu	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin, oksasilin.
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 ile Aynı
Bilinmiyor		(4)	AVS-1	Herhangi bir moleküler veya fonksiyonel gruba uymayan, sekanslanamamış ya da özellikleri tanımlanamamış enzimler

### 2.8.3.3.1. Grup 1 Kromozomal Beta Laktamazlar

Grup 1 kromozomal beta laktamazlar sefalosporinazlardır ve bu enzimlerin moleküler sınıfı 'C'dir. Salmonella türleri dışında hemen tüm Gram-negatif bakterilerde kromozom kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlar bulunur fakat miktar, sentez yolu ve dirençteki rolleri açısından farklılıklar gösterir. Bu enzimler, yüksek düzeyde veya düşük düzeyde olabilmekte ve indüklenebilen enzimler ve yapısal enzimler olarak bulunabilmektedir. *Shigella spp.*, *E. coli*, *P. mirabilis*'de düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır. Bunların miktarları ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeydedir. Bununla birlikte *E. coli*

izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir<sup>37</sup>.

İndüklenebilir kromozomal enzimler *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'de bulunan kromozomal beta laktamazlar indüklenebilen türdedir<sup>40</sup>. Bu enzimler ortamda bir beta-laktam ajan varsa salınırlar. Normalde indüksiyon etkisi geçici olup indükleyici ajanın etkisi kalkınca enzimler tekrar bazal düzeye dönmektedir. Ancak bu tip beta-laktamazları üreten türlerde asıl sorun, indüksiyon olmaksızın yüksek oranda beta-laktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır. AmpD genlerinde defekt bulunan dereprese mutantlar bakteri popülasyonunda  $10^5$ - $10^7$  sıklığında bulunurlar. İkinci kuşak ve üçüncü kuşak sefalosporinler, aztreonam ve üreidopenisilinler bu beta-laktamazlar için zayıf indükleyiciler olmalarına karşın, üretilen enzime duyarlıdırlar. Dolayısıyla, bu ajanlar, tedavide tek başlarına kullanılmaları halinde dereprese mutantları seçme özelliği göstermekte, bunun sonucunda da tedavi başarısızlıkları ortaya çıkmaktadır<sup>37</sup>.

#### **2.8.3.3.2. Grup 2 Plazmid Kontrolündeki Beta Laktamazlar(Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar)**

Plazmid kontrolündeki beta laktamazlar A ve D molekül sınıfını içermekte olup en geniş kategoriyi oluşturmaktadırlar. Bunlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbapenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar. Bu beta laktamazların en büyük grubu türler arasında kolayca yayılabilen geniş spektrumlu beta laktamazlardır. Moleküler sınıf A'da olan ve 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık izole edilen türlerde yaygın olmaları ve plazmid aracılığıyla taşınmaları nedeni ile klinik açıdan önem taşımaktadırlar. Grup 2b'de yer alan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 'geniş spektrumlu' enzimlere, ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2, SHV-1 beta laktamaz enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. Bu enzimler penisilinler ve 1.kuşak sefalosporinleri etkin bir şekilde parçaladıkları halde geniş spektrumlu beta laktamazlara (yeni sefalosporinler, monobaktamlar) sınırlı etki gösterirler

veya etkisizdirler. Klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar<sup>42</sup>.

Beta laktamaz sınıflandırılmasında 2d grubunda ve moleküler sınıf D'de yer alan OXA grubu enzimlerin tercih ettikleri substrat kloksasilindir. OXA-10 enzimi, OXA-1'den OXA-10'a kadar olan OXA enzimleri içinde daha geniş spektrumlu bir enzimdir. Sefaperazona yüksek direnç oluşturmakta, eğer çok miktarda sentezlenirse aztreonam, seftriakson ve sefotaksim duyarlılıklarında azalmaya yolaçabilmektedir. Son yıllarda OXA enzimlerinin de genişlemiş spektrumlu mutantlarının çıktığı tespit edilmiştir. TEM ve SHV enzimlerinde olduğu gibi OXA enzimlerinin genlerinde oluşan mutasyonlar enzim molekülünde genellikle 1-4 amino asidin değişmesine, dolayısıyla farklı bir enzim molekülünün oluşmasına yol açar. Bu genişlemiş spektrumlu türevlerin (OXA-11,14-17) özellikle nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinde giderek önem kazandığı bilinmektedir<sup>39</sup>.

GSBL'ler, oksiminino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Yapısal özellikleri açısından GSBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır. Bunlar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır. GSBL'lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerir ve Ambler'in moleküler sınıflamasına göre A sınıfında yer alır. Beta laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasına göre ise GSBL'ler 2be, 2e, 2d alt gruplarına ayrılmaktadır. GSBL'ler oksiminino sefalosporinler ve aztreonamın ile birlikte birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil penisilinleri de hidrolize uğratırlar. Fakat bu enzimlerin sefamisin grubu sefalosporinlere (sefotetan ve sefoksitin) karşı etkisi yoktur. Sefamisin grubuna etkili olmamaları, GSBL'leri AmpC tipi beta laktamazlardan ayıran önemli karakteristik özellikleridir. Ancak yine de istisnai durumların söz konusu olabileceği unutulmamalıdır. Örneğin TEM 52'nin sefotetan ve moksalaktamı hidrolize uğratabildiği gösterilmiştir. GSBL'lerin çoğunluğu, özellikle de TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL de mevcuttur<sup>39</sup>.

#### 2.8.3.3.2.1. Grup 2a enzimler

Penisilini hidrolize eden ve klavulanik asite duyarlı enzimler bu alt grupta yer almaktadır. *Staphylococcus aureus*'un enzimleri ve *Bacillus cereus*'un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır<sup>39</sup>.

#### 2.8.3.3.2.2. Grup 2b enzimler

Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eden, tazobaktam, sulbaktam ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazları içerirler. Plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri de bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, tikarsilin, karbenisilin, sefalotin gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları sebebiyle geniş spektrumlu denilmiştir ve bu enzimler *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. TEM-1 beta-laktamazı özellikle *E. coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 enzimi ise özellikle *K. pneumoniae* suşlarında bulunur<sup>43</sup>.

#### 2.8.3.3.2.3. Grup 2be enzimler

Beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam gibi geniş spektrumlu beta-laktamlara da etki eden yeni TEM-ve SHV-enzimleri ortaya çıkmıştır. Bu enzimler grup 2be'de yer almakta ve ESBL (extended-spectrum beta-lactamase; genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar) olarak adlandırılmaktadır. Bunlar özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden bir diğeri de PER-1 enzimi olup, bu enzim ilk kez Türkiye'de üretilen suşlarda tespit edilmiştir<sup>44,45,46</sup>.

#### **2.8.3.3.2.4. Grup 2br enzimleri**

Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu gruba alınmış olup, TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi de bu gruptadır<sup>39</sup>.

#### **2.8.3.3.2.5. Grup 2c enzimleri**

Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V. cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır<sup>39</sup>.

#### **2.8.3.3.2.6. Grup 2d enzimleri**

Bu grup kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içermekte olup OXA enzimleri de bu gruptadır. Bu enzimlerden OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta tanımlanmıştır<sup>45</sup>. Klavulanik asite ve sulbaktama dirençlidirler. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer almakta iken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır<sup>39</sup>.

#### **2.8.3.3.2.7. Grup 2e enzimleri**

Grup 2e yer alan beta-laktamazlar sefalosporinaz olmakla birlikte, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B. fragilis*'in CepA enzimi, *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 ve *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Bla-I enzimleri de bu grupta yer almaktadır<sup>39</sup>.

#### **2.8.3.3.2.8. Grup 2f enzimleri**

*E. cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S. marcescens*'in Sme-1 enzimi bu grupta yer almakla birlikte, karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır<sup>39</sup>.

### 2.8.3.3.3. Grup 3 Beta Laktamazlar (Metallo- $\beta$ -Laktamazlar)

Metallobetalaktamazlar(MBL) Bush sınıflamasına göre Grup 3'te, Ambler sınıflamasına göre Sınıf B'de yer alırlar. İmipenemi ve meropenemi iyi hidrolize ederler ancak aztreonama etkisizdirler. Aktif bölgelerindeki çinko iyonu aracılığıyla karbapenemleri hidrolize ettikleri için karbapenamazlar olarak da adlandırılırlar. Bu enzimlerin aktivitesi çinkoya bağımlı olup, EDTA veya merkaptopropionik asit ile inhibe oldukları için, MBL tanımlama testlerinde de bu enzimlerin EDTA ile inhibe olma özelliğinden yararlanılır<sup>47</sup>.

Metallobetalaktamazlar fonksiyonel olarak 3a, 3b ve 3c alt gruplarına ayrılır. Grup 3a'da bulunan enzimlerin genellikle penisilinleri imipenemden daha hızlı olarak hidrolize ettikleri bilinmektedir. *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *A. baumannii*, *Shigella flexneri*, *K. pneumoniae* gibi türlerde saptanan IMP 1-8 ve *P. aeruginosa*'da saptanan VIM 1-3 enzimleri de bu grupta yer alan enzimlerdendir. Grup 3b enzimleri *Aeromonas* türlerinin metalloenzimlerini kapsamakla birlikte, bunlar gerçek karbapenamazlarıdır. Grup 3c enzimleri ise *Legionella gormanii*'de bulunur ve yüksek seflosporinaz aktivitesi vardır<sup>48</sup>.

IMP-1 (Imipenemase) enzimi ilk kez Japonya'da, 1992-1994 yılları arasında karbapenem dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında gösterilmiştir. Önceleri sadece kromozomal olarak kodlandığı düşünülen bu enzimin *blaIMP-1* geninin, plazmid ve integrona yerleşik olduğu saptanmış ve direncin aktarılabılır olması nedeniyle endişelere yol açmıştır<sup>30</sup>.

Bu güne kadar *P. aeruginosa*'da saptanan IMP varyantları ise: IMP-1 (Japonya, Brezilya, Kore), IMP-2 (Japonya), IMP-6 (Japonya), IMP-7 (Kanada, Malezya), IMP-9 (Çin), IMP-10 (Japonya), IMP-11 (Japonya), IMP-13 (İtalya), IMP-14 (Tayland), IMP-15 (Meksika), IMP-16 (Brezilya), IMP-18 (ABD), IMP-20 (Japonya), IMP-21 (Japonya), IMP-22 (Avusturya), IMP-25 (Çin), IMP-26 (Singapur) olup, bu enzimlerin genellikle klas 1 integronlarla veya klas 3 integronlarla kodlandığı tespit edilmiştir<sup>2,49</sup>.

VIM(Verona Imipenemase) ilk kez 1997 yılında İtalya'nın Verona kentinde bir *P. aeruginosa* izolatında saptandığı için enzime VIM-1 adı verilmiştir. Enzimin Verona kentinde saptanması ve imipeneme dirençli olması nedeniyle enzime VIM-1 adı verilmiştir<sup>60</sup>.

VIM-2 enzimi ise ilk kez Fransa'da, 1996 yılında, nötropenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa* izolatında saptanmış olup bu izolatın seftazidim, sefepim ve imipenemin de içinde bulunduğu pek çok beta-laktam ajana dirençli olduğu saptanmıştır<sup>51</sup>.

Bu güne kadar *P. aeruginosa*'da tespit edilmiş VIM tipi metallo beta laktamazlar ise: VIM-1 (İtalya), VIM-2 (Fransa, Yunanistan, İtalya, Japonya, Kore, Potekiz, İspanya, Hırvatistan, Polonya, Şili, Venezuela, Arjantin, ABD), VIM-3 (Tayvan), VIM-4 (Fransa, Yunanistan, İsveç, Polonya), VIM-5(Türkiye), VIM-7 (ABD), VIM-8 (Kolombiya), VIM-9 (İngiltere), VIM-10 (İngiltere), VIM-11a (Arjantin), VIM-11b (İtalya), VIM-13 (İspanya), VIM-14 (İtalya), VIM-15 (Bulgaristan), VIM-16 (Almanya), VIM-17 (Yunanistan), VIM-18 (Hindistan), VIM-20 (İspanya) olup, bu enzimler de sıklıkla integronlarla taşınmaktadır<sup>47,52</sup>.

SPM-1 (SauPaulo Imipenemase) enzimi ilk kez 1997 yılında Brezilya'da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmış olup, bu izolatın, Gram negatif bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara (kolistin dışında) dirençli olduğu saptanmıştır<sup>53</sup>.

GIM(German Imipenemase) 2002 yılında Almanya'da farklı hastalardan izole edilmiş beş *P. aeruginosa* izolatında yeni bir metallobetalaktamaz türü saptanmış olup GIM-1 olarak adlandırılmıştır. GIM-1 enzimini kodlayan gen, klas 1 integron aracılığıyla taşınmaktadır<sup>54</sup>.

#### **2.8.3.3.4. Metallo Beta Laktamazların Laboratuvar Tanısı**

*P. aeruginosa* izolatının karbapenemaz ürettiğini düşündüren ilk bulgu karbapenem MİK değerinde artış saptanmasıdır. VIM, IMP, GIM, SIM ve SPM gibi metallobetalaktamaz üreten *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem MİK'leri genellikle 8 µg/mL'den 128 µg/mL'nin üzeri gibi farklı değer aralıklarında olabilmektedir. Fakat bu enzimlere ait genler *E. coli* izolatlarında bulunduğu bu MİK değerleri 0.5 µg/mL gibi çok daha düşük değerlerde olabilmektedir. Bu da *P. aeruginosa*'da karbapenem direncine effluks sistemi ya da membran



geçirgenliğinin azalması gibi başka mekanizmaların da katkıda bulunduğunu göstermektedir<sup>54</sup>. Konvansiyonel metodlarla ve otomotize sistemlerle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinde karbapenemaz üretiminin tespitinde problemler yaşanmaktadır<sup>52</sup>.

MBL üretiminin hızlı tespiti için disk diffüzyon yöntemine dayalı bazı fenotipik test yöntemleri ileri sürülmüştür. Bu testler MBL enzimlerinin etkinliğinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2-merkaptopropionik asit (MPA) gibi metal şelatörleri ile inhibe edilmesi prensibine dayalı yöntemlerdir. Bununla birlikte MBL genlerinin varlığını doğrulamak amacıyla PZR ve benzeri moleküler yöntemlere de gereksinim duyulmaktadır<sup>47</sup>.

#### **2.8.3.3.4.1. Modifiye Hodge Testi**

Hodge tarafından *Neisseria gonorrhoeae* ve diğer bakterilerde beta laktamaz üretiminin tayini için geliştirilmiş olan bu test, Lee ve ark. tarafından *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.* için MBL tayininde kullanılmak için modifiye edilmiştir.

*E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak MHA plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilir. Plağın merkezine ertapenem (10 µg) ya da meropenem (10 µg) diski yerleştirilir. Test edilecek suşlar, bu diskin dört bir kenarından perifer doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda yonca görünümü olması pozitif olarak kabul edilir<sup>56</sup>.

Fakat bu testin MBL üretiminin saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olduğu sonucuna varılmıştır<sup>57</sup>.

#### **2.8.3.3.4.2. Çift disk sinerji testleri**

Metallo-beta-laktamaz saptanması çalışmalarında, imipenem, seftazidim ya da sefepim disklerine etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2-merkaptopropionik asit ve merkapto asetik asit emdirilmesiyle yapılan çift disk

sinerji testleri kullanılabilir. Test edilecek imipenem dirençli suşların bir gecelik inkübasyonu sonrası elde edilen kültür süspansiyonu MHA plağının üzerine 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde inoküle edilir. Plak yüzeyi kuruduktan sonra 10 µg imipenem diski yerleştirilir ve imipenem diskinin 15-20 mm ötesine 10 µl, 0.5 molarlık EDTA solüsyonu emdirilmiş disk yerleştirilir. 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir<sup>56</sup>.

#### **2.8.3.3.4.3. Kombine disk difüzyon testi**

Test edilecek izolat, disk difüzyon yönteminde olduğu gibi Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine ekilir. Plağa ikişer adet imipenem (10 µg) diski yerleştirilip disklerin birer tanesine 10 µl 0.5 M EDTA solüsyonu damlatılarak kombine diskler (10 µg) oluşturulur. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra, imipenem diski ve bu disklerin EDTA ile kombine edildiği disklerin etrafındaki zon çapları ölçülüp aradaki fark her bir suş için kaydedilir. EDTA'lı diskin çevresindeki inhibisyon zon çapı, EDTA'sız disk etrafındaki zon çapından en az 7 mm veya daha büyükse sonuç pozitif olarak değerlendirilir<sup>57</sup>.

#### **2.8.3.3.4.4. E test yöntemi**

İmipenem veya seftazidim MİK değerinin, bu antibiyotiklerin EDTA(etilendiamintetraasetik asit) veya MPA(merkaptopropionik asit) gibi şelatörler ile kombinasyonlarının MİK'leri ile kıyaslanması esasına dayalı olan bu testte ticari olarak üretilmiş olan E test stripleri kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, imipenem MİK değeri 16'dan büyük ve IMP/IMP+EDTA E test (IP/IPI E test) MİK oranlarının 8 kat azaldığı saptanan izolatların MBL pozitif olarak yorumlanabileceği ortaya konmuştur<sup>58</sup>.

#### **2.8.3.3.4.5. Moleküler Testler**

MBL varlığının araştırılmasında özgülüğü en yüksek olan yöntemler moleküler testlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulaması kolay ve en hızlı yöntemdir fakat yüksek özgülükte DNA primerlerine ihtiyaç olması, varyantları birbirinden ayırt edemiyor olması ve yeni varyantların saptanamaması yöntemin dezavantajlarıdır.

MBL saptanmasında kullanılan diğer moleküler yöntemler izoelektrik odaklama, poliakrilamid jel elektroforezi, nükleotid sekans analizi olmakla birlikte, klonlama ve sekans analizi altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir<sup>47</sup>.



### 3. GEREÇ-YÖNTEM

#### 3.1.Çalışma Grubu

Çalışmaya, 2015 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ndeki servis ve polikliniklerden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve antibiyotik duyarlık testi sonucu imipenem ve/veya meropeneme orta duyarlı/dirençli saptanan 58 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Çalışma izolatlarının izole edildiği metaryal ve hastanın yattığı servis Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 5. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri**

<b>İzolat numarası</b>	<b>Örnek</b>	<b>Klinik</b>
PA1	Trakeal aspirat	Beyin Cerrahi Servisi
PA2	Balgam	Enfeksiyon Servisi
PA3	Balgam	Onkoloji Servisi
PA4	Yara	Onkoloji Servisi
PA5	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA6	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA7	İdrar	Üroloji Servisi
PA8	Kateter	Çocuk Yoğun bakım
PA9	Boğaz	Çocuk Yoğun bakım
PA10	Trakeal aspirat	Beyin Cerrahi Servisi
PA11	İdrar	Üroloji Servisi
PA12	Yara	Çocuk Yoğun Bakım
PA13	Yara	Genel Cerrahi Servisi

PA14	Doku	Genel Cerrahi Servisi
PA15	İdrar	Çocuk Yoğun Bakım
PA16	Trakeal aspirat	Çocuk Yoğun Bakım
PA17	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA18	İdrar	Nefroloji Servisi
PA19	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA20	Yara	Genel Yoğun Bakım
PA21	Kateter idrarı	Üroloji Servisi
PA22	Yara	Üroloji Polikliniği
PA23	Trakeal aspirat	Nefroloji Yoğun Bakım
PA24	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA25	İdrar	Üroloji Polikliniği
PA26	Trakeal aspirat	Nöroloji Yoğun Bakım
PA27	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA28	Trakeal aspirat	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım
PA29	Kateter idrarı	Onkoloji Yoğun Bakım
PA30	Balgam	Genel Cerrahi Servisi
PA31	Kateter idrarı	Üroloji Polikliniği
PA32	Yara	Nöroloji Yoğun Bakım
PA33	İdrar	Nefroloji Servisi
PA34	Kan	Genel Yoğun Bakım
PA35	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA36	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA37	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA38	Doku	Plastik Cerrahi Polikliniği

PA39	Trakeal aspirat	Çocuk Enfeksiyon Servisi
PA40	Diren	Onkoloji Servisi
PA41	Doku	Enfeksiyon Servisi
PA42	Kan	Genel Yoğun Bakım
PA43	Trakeal aspirat	Genel Yoğun Bakım
PA44	Kateter	Çocuk yoğun bakım
PA45	İdrar	Üroloji Polikliniği
PA46	Safra	Onkoloji Servisi
PA47	Yara	Enfeksiyon Servisi
PA48	Trakeal aspirat	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım
PA49	Yara	Genel Cerrahi Yoğun Bakım
PA50	Balgam	Nefroloji Servisi
PA51	Doku	Enfeksiyon Servisi
PA52	Yara	Enfeksiyon Servisi
PA53	İdrar	Üroloji Polikliniği
PA54	Doku	Plastik Cerrahi Servisi
PA55	İdrar	Üroloji Polikliniği
PA56	Kan	Nöroloji Servisi
PA57	Kan	Hematoloji Yoğun Bakım
PA58	Yara	KBB Servisi

### 3.2. Araç ve gereçler

Kullanılan sarf malzemeleri şunlardır:

- 0.2 mL'lik ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri (Grainer Bio-One, Almanya),

- 10 µL'lik, 100 µL'lik ve 1000 µL'lik otomatik pipet uçları (Grainer Bio-One, Almanya).

Kullanılan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim

Dalı'na ait cihazlar ise şunlardır:

- 37°C'lik etüv (Mettler, İngiltere),
- Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific, ABD),
- -20°C soğutucu (Uğur, Türkiye),
- -80°C soğutucu (Thermo Scientific, ABD),
- 4°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye),
- Pastör fırını (Memmer UE 500, İngiltere),
- Otoklav (Hirayama HV-L Seies 50L),
- Otomatize kültür sistemi (BACTEC™ 9240 Blood Culture System) (Becton Dickinson Company, ABD)
- Otomatize mikrobiyolojik bakteri tanımlama sistemi (Vitek 2 cihazı, BioMerieux, Fransa),
- CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD),
- Mikropipet seti (HTL LAB, Discovery comfort, 1000µL, 200µL, 100µL, 10µL),
- pH metre (Hanna, İtalya),
- Vorteks (Vortex Genie 2),
- Santrifüj (Thermo Scientific, ABD),
- Hassas terazi (Scaltec),
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye),
- Termal döngü cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler personal),
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific Owl, ABD), ,
- UV illüminatör (Wilber Lourmat, Fransa),
- Distile su cihazı (GFL-2104, Almanya).

Ayrıca anabilim dalında mevcut olan vidalı kapaklı cam tüp, 250 mL'lik erlenmayer, 50 mL'lik mezür, cam balon joje, kaynatma kabı, jel dökme tepsi ve tarak kullanıldı.

### 3.2.1. Kullanılan kitler ve kimyasallar

- 10 µg imipenem içeren disk (Oxoid, İngiltere),
- 10 µg meropenem içeren disk (Oxoid, İngiltere),
- 10 µg doripenem disk (Oxoid, İngiltere) ,
- Vitek 2 GN identifikasyon kiti (lot 241372540, BioMerieux SA, Fransa),
- Vitek 2 AST-N326 antibiyogram kiti (lot 766387410, BioMerieux SA, Fransa),
- İmipenem E-Test (BioMerieux, Fransa),
- Meropenem E-Test (BioMerieux, Fransa),
- Doripenem E-Test (BioMerieux, Fransa),
- İmipenem/imipenem EDTA E-Test (BioMerieux, Fransa) ,
- Tris HCl (Sigma, Almanya),
- Tris Baz (Sigma, Almanya),
- EDTA (Sigma, Almanya),
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma, Almanya),
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya),
- Sodyum klorit (NaCl) (Merck, Almanya),
- Gliserol (Merck, Almanya),
- Kalsiyum Klorür (CaCl<sub>2</sub>) (Sigma, Almanya),
- Etidyum bromür (Merck, Almanya), PCR için Agroz (HIMEDIA, Hindistan),
- dNTP seti (Fermentas, ABD),
- 100 bp DNA marker (Fermentas, ABD) kullanıldı.

### 3.2.2. Kullanılan besiyerleri

Hazır toz besiyerleridir. Üretici firma önerileri doğrultusunda pH'si 7.4 olan distile suda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilerek hazırlandı.

- Blood agar base (Biomerieux, lot 1004214140, Fransa)



- Mueller Hinton Agar (Biomérieux, lot 1004197780,Fransa)
- Bakteri identifikasyon ve Antimikrobial duyarlılık test buyyon (Becton Dickinson Company, ABD).

İzolatların saklanması için %16 gliserol içeren triptik soy broth besiyeri kullanıldı. 1 g TSB (glikoz içermeyen), 10 mL gliserol ve 40 mL distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılıp eritildi, pH 7.2' ye ayarlandı. 115°C' de 10 dk otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 mL'lik mikrosantifüj tüplerine 1'er mL hacimlerde dağıtıldı.

### **3.2.3. Çözeltiler**

#### **3.2.3.1. EDTA (0.5 M pH: 8.0)**

100 mL distile suda 18.61 gr disodyum EDTA çözdürülerek 0.5 M EDTA solüsyonu elde edilip, NaOH ile pH'sı 8.0'e ayarlandı. Otoklav sterilizasyonu yapılarak, kullanıldığı süre içerisinde 4 °C'de muhafaza edildi.

#### **3.2.3.2. TE Tamponu**

TE tamponu, son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde hazırlandı. Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1mL ve EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µL hacminde, 98.8 mL steril distile su üzerine eklenerek tampon hazırlanıp vortekslenerek karıştırıldı.

#### **3.2.3.3. dNTP Karışımı**

Yoğunlukları 100 mM olan dATP, dTTP, dCTP ve dGTP 'nin her birinden 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 20'şer µL koyuldu ve her birinin üzerine 720 µL steril deiyonize su ilave edildi. Bu şekilde 2.5 mM yoğunlukta dNTP karışımı elde edildi ve bu karışım 400 µL'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

#### **3.2.3.4. Primer Karışımı**

Liyofilize haldeki primerler steril deiyonize su eklenerek son konsantrasyonu 100 pmol/ $\mu$ L olacak şekilde stok çözeltiler elde edildi. 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine primerlerin stok çözeltilerinin her birinden 20'şer  $\mu$ L koyuldu ve üzerine 360  $\mu$ L steril deiyonize su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/ $\mu$ L olan primer karışımı hazırlandı. Kullanılacağı zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### **3.2.3.5. TBE Tamponu (5x)**

Beher içerisine 54 g Tris Baz, 27.5 g Borik Asid, 3.72 g EDTA tartılarak kondu. Yaklaşık 700 mL distile su ile çözüldü ve pH 8.3'e ayarlanarak hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

#### **3.2.3.6. Etidyum Bromür**

100 mg Etidyum Bromür 10 mL distile su ile son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde çözülüp koyu renkli cam şişe içinde oda ısısında muhafaza edildi.

### **3.3. Yöntem**

#### **3.3.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirmesi**

##### **3.3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

Kliniklerden gönderilen örnekler Kanlı agar ve Eozin-metilen-blue (EMB) agar besiyerlerine, kateter ve doku örnekleri tiyogkikolatlı buyyona, kan kültürler BACTEC kan kültür şişelerine alınmış ve BACTEC kan kültür cihazında takip

edilmiştir. 18-24 saatlik inkübasyon sonucu üremeler değerlendirilmiştir. Koloni morfolojisi olarak *Pseudomonas*'a benzeyen laktoz negatif, katalaz negatif, oksidaz pozitif, non fermentatif Gram negatif basiller tür tanımlaması için Vitek 2 GN identifikasyon kiti (BioMerieux, Fransa) ile yapılmıştır. Firmanın önerdiği prosedüre göre çalışılarak Vitek-2 otomatik identifikasyon cihazında (BioMerieux, Fransa) değerlendirilmiştir.

Tür tanımlama işlemi sonrasında, bu izolatlar imipenem, meropenem ve doripenem için Kirby-Bauer disk diffüzyon testi yapılmıştır. İmipenem, meropenem veya doripenemden herhangi birine orta duyarlı veya dirençli tespit edilen izolatların Vitek 2 AST-N326 antibiyogram kiti (BioMerieux, Fransa) kullanılarak antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış ve minimal inhibitör konsantrasyonları tespit edilmiştir. Duyarlılık testlerinin sonuçları EUCAST(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edilmiştir. Ayrıca direnci doğrulamak ve MIK değerini bulmak için bu üç antibiyotiğe Gradyent testi ( E test, Biomerieux, Fransa ) çalışılmıştır. Standart suş olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.

*Pseudomonas aeruginosa* olarak tiplendirilen ve imipenem veya meropenemden herhangi birine orta duyarlı veya dirençli tespit edilen izolatlar, çalışma yapıncaya kadar %16 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde – 80°C'de saklanmıştır<sup>59</sup>.

### **3.3.1.2. Metallobetalaktamazların Fenotipik Olarak Tanımlanması**

#### **3.3.1.2.1. İmipenem/İmipenem-EDTA Kombine Disk Testi**

EDTA solusyonu hazırlanışı: Bunun için, 100 mL distile suda 18.61 gr disodyum EDTA çözdürülerek 0.5 M EDTA solüsyonu elde edilip, NaOH ile pH'sı 8.0'e ayarlandı. Otoklav sterilizasyonu yapılarak, kullanıldığı süre içerisinde 4 °C'de muhafaza edildi.

Testin yapılışı: Çalışma izolatları %5 koyun kanlı agara pasajlanarak taze kültürleri elde edildi. Steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları MHA besiyeri yüzeyine eküvyon yardımı ile yayıldıktan sonra plağa iki adet IMP (10 µg) diski yerleştirildi. Disklerin birer tanesine 0.5 M EDTA solüsyonundan 10 µL pipetle damlatılarak diskin solüsyonu absorbe etmesi beklendi. 36±1°C'de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü. EDTA damlatılan IMP diskinin çevresindeki inhibisyon zon çapı, EDTA'sız IMP diski zon çapından en az 7 mm daha büyükse sonuç pozitif olarak kabul edildi<sup>60</sup>.

#### **3.3.1.2.2. E-test yöntemi**

Bakterilerin bir gecelik taze kültürlerden McFarland 0.5 standardına göre bakteri süspansiyonları hazırlandı ve MHA'a eküvyon yardımı ile homojen bir şekilde yayıldı. Plak yüzeyi kuruduktan sonra E-test şeritleri yerleştirildi. 37°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra plaklar değerlendirildi. MIK değerinde 8 kat ve/veya daha fazla azalma olması veya fantom(hayalet zon) oluşması metallobetalaktamaz pozitifliği olarak yorumlandı<sup>60</sup>.

#### **3.3.1.3. Metallo Beta Laktamazların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması**

##### **3.3.1.3.1. DNA İzolasyonu**

Çalışma izolatlarının %5 koyun kanlı agara pasajlanmasıyla elde edilen taze kültürlerinden, 3 mL'lik Mueller Hinton buyyona tek koloni ekimi yöntemiyle pasajları yapıldı. 37°C'de, 200 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bir gece inkübe edildikten sonra izolatların ürettiği gözlenen bu sıvı besiyerinden 1.5 mL alınarak mikrosantrifüj tüpüne kondu. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant nazikçe dökülerek pelletin üzerine 1 mL TE tamponu eklenip vortekslendi. Bu karışım 5000 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edilip

süpernatant nazikçe döküldükten sonra pelletin üzerine 1 mL deiyonize su koyuldu ve vortekslendi. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı, süpernatant atılarak pelletin üzerine 500 µL deiyonize su eklendi ve vortekslendi. Bakteri süspansiyonu 95°C'de 10 dakika kaynatıldıktan sonra 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. İçinde bakteriyel DNA'nın bulunduğu süpernatanın 400 µL'si yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve PZR çalışmaları yapılmaya kadar -20°C'de saklandı<sup>5</sup>.

### 3.3.1.3.2. Metallo Beta Laktamaz Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler

MBL genlerinden VIM-1, VIM-2, IMP-1, IMP-2, SPMi GIM ve oksasilinazlardan OXA-23, OXA-24 varlığının araştırılmasında kullanılan primerler tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6. Metallo Beta Laktamaz Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler**

Primer Adı	Sekans (5'-3')	Ürün Uzunluğu	Kaynak
VIM1-F VIM1-R	GTAAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG CTACTCGGCGACTGAGC	799	61
VIM2-F VIM2-R	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG CTACTCAACGACTGAGCG	801	61
IMP1-F IMP1-R	ATGAGCAAGTTATCTGTATTC TTAGTTGCTTGGTTTTGATGG	741	61
IMP2-F IMP2-R	ATGAAGAAATTATTTGTTTTATG TTAGTTACTTGGCTGTGATG	741	61
SPM-F SPM-R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	61
GIM-F GIM-R	AGAACCTTGACCGAACGCAG ACTCATGACTCCTCACGAGG		61
OXA-23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	62

OXA-23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA-24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	245	62
OXA-24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		

### 3.3.1.3.3. Reaksiyon İçeriğinin Hazırlanması

Reaksiyon bileşenleri Tablo 7’de gösterildiği oranlarda kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Kullanılacak kimyasallar dondurucudan çıkarıldıktan sonra çözünmesi beklendi ve 5-10 saniye vortekslendi. Tablo 7’de belirtilen kimyasallar, buz üzerinde, sırayla mikrosantrifüj tüpüne pipetlendi. Taq polimeraz enzimi ise kullanılmadan hemen önce -20°C’den çıkarıldı ve pipetlendi. Elde edilen 48 µL hacmindeki reaksiyon karışımı vortekslendi. Daha sonra test edilecek bakteriler, önceden izole edilerek -20°C’de saklanmış olan DNA’larından 2 µL’lik hacimlerde her biri için hazırlanmış olan reaksiyon karışımının üzerine pipetlendi. Reaksiyon karışımı termal döngü cihazına PZR işlemini gerçekleştirmek üzere konuldu<sup>5</sup>.

**Tablo 7. Reaksiyon bileşenleri**

Reaksiyon bileşeni	Bir örnek için
Tampon(5x)	5 µL
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
Primer karışımı (10 pmol)	0,5 µL
Taq polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
Ddw	36,75 µL
DNA	2 µL
Reaksiyonun toplam hacmi	50 µL

#### **3.3.1.3.4. Genlerin Amplifikasyonu**

Hazırlanan reaksiyon bileşenleri otomatik termal döngü cihazına yerleştirildi. IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, GIM, SPM, OXA-23, OXA-24 genleri için 94°C'de 5 dakika denatürasyon sonrası; her döngü için 94°C'de 20 saniye denatürasyon, 53°C'de 45 saniye primer birleşmesi, 72°C'de 30 saniye polimerizasyon aşamalarını içeren 35 döngü uygulandı ve 72°C'de 6 dakika polimerizasyon süresi eklendi<sup>61,5,62</sup>.

#### **3.3.1.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme**

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin değerlendirmesi, agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. 10 µg/mL etidyum bromür içeren %2 yoğunlukta agaroz jel hazırlandı. Her bir tepkime tüpünden 7 µL alındı ve 3 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ve son kuyucuklara 10 µL 100 bp adımlı DNA marker yüklendi ve örnekler önce 10 dakika boyunca 80 voltta yürütüldü, sonra 30 dakika boyunca 100 voltta yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV transilluminatörde gözlendi.

#### **3.3.1.4. DNA Dizi Analizi**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile metallobetalaktamaz üretiminden sıklıkla sorumlu olan IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, SPM, GIM gen bölgelerinin varlığı araştırılmış, pozitif bulunan örneklerin doğrulanması için amplifiye gen ürünlerine "Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak sense ve antisens zincirlerinin "Cycle Sequence" PZR'ı yapıldı. Safılaştırma işlemi sonrasında, "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi gerçekleştirilerek, kromatografi şeklinde DNA dizi analizi verileri elde edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

Tablo 8’de verildiği gibi imipenem ve/veya meropeneme orta duyarlı/dirençli 58 *P. aeruginosa* izolatının kliniklere göre dağılımı; 15’i dahili kliniklerden, 12’si genel yoğun bakımdan, 10’u cerrahi kliniklerden ve diğerleri değişik klinikler olduğu görülmektedir(Tablo 8).

**Tablo 8. İzolatların kliniklere göre dağılımı**

KLİNİK	İZOLAT(Sayı)	Yüzde(%)
Dahili Klinikler	15	25,8
Genel Yoğun Bakım	12	20,6
Cerrahi Klinikler	10	17,2
Dahili Yoğun Bakımlar	6	10,3
Cerrahi Yoğun Bakımlar	1	1,7
Çocuk Yoğun bakım	6	10,3
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinik	1	1,7
Çeşitli Poliklinikler	7	12,0
<b>Toplam</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

### 4.2. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı

İzolatların 17’si (% 29.3) trakeal aspirattan, 9’u (%15.5) idrar örneklerinden, 10’u (%17.2) yara örneklerinden, 5’i (%8.6) balgam örneklerinden ve 17’si (%29.3) diğer örneklerden izole edilmiştir(Tablo 9).

**Tablo 9. İzolatların materyallere göre dağılımı**

Materyal	Sayı	Yüzde(%)
Trakeal aspirat	17	29,3



İdrar	9	15,5
Yara	10	17,2
Balgam	5	8,6
Doku	5	8,6
Kan	4	6,8
Kateter idrarı	3	5,1
Kateter	2	3,4
Diren	1	1,7
Safra	1	1,7
Boğaz	1	1,7
<b>Toplam</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

### 4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

#### 4.3.1. Disk diffüzyon ve otomatize sistem ile antibiyotik duyarlılıklarının saptanması

İzolatların; imipenem, meropenem, doripenem, amikasin, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, levofloksasin, piperasilin için disk diffüzyonla tespit edilen antimikrobiyal duyarlılıkları (Şekil 1) ve imipenem, meropenem, kolistin, amikasin, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, levofloksasin, netilmisin, piperasilin için otomatize sistem (Vitek, BioMerieux) ile tespit edilen antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları Tablo 10, Tablo 11 ve tablo 12'de verilmiştir.

**Tablo 10. İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon ve otomatize sistem (Vitek 2, BioMerieux) antibiyotik duyarlılık testi ile çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları**

Antibiyotik	Dirençli(R )		Orta duyarlı(I)		Hassas(S)	
	DD (n/%)	OS (n/%)	DD (n/%)	OS (n/%)	DD (n/%)	OS (n/%)
Piperasilin	36(62)	33(56)	-	15(25)	22(38)	9(19)
Seftazidim	28(48)	23(39)	-	18(31)	30(52)	17(30)
Sefepim	23(39)	19(32)	-	24(41)	35(61)	15(27)

İmipenem	58(100)	57(99)	-	1(1)	-	-
Meropenem	43(74)	43(74)	15(26)	15(26)	-	-
Amikasin	11(18)	13(22)	4(6)	-	43(74)	45(78)
Gentamisin	17(30)	16(29)	-	1(1)	41(70)	41(70)
Netilmisin	-	19(34)	-	2(3)	-	37(63)
Siprofloksasin	17(30)	18(31)	-	13(22)	41(70)	27(47)
Levofloksasin	22(38)	32(55)	10(17)	3(6)	36(45)	23(39)
Kolistin	-	-	-	-	58(100)	58(100)

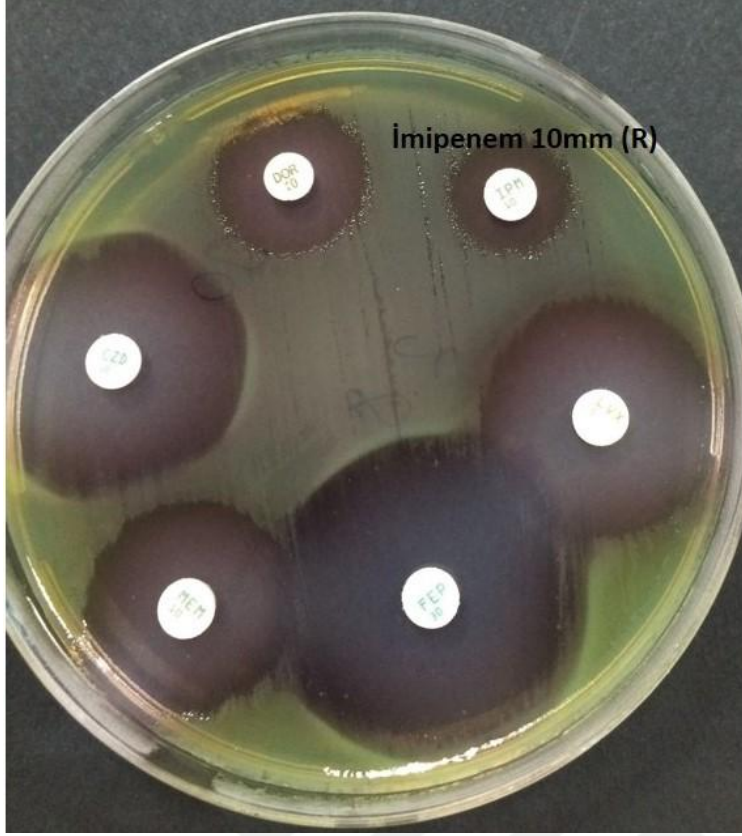
(DD: Disk difüzyon, OS: Otomatize sistem)

**Tablo 11. İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile saptanan duyarlılık sonuçları**

İzolat	PIP	CAZ	FEP	IMP	MEM	DOR	AN	GN	CIP	LEV	COL
PA1	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S
PA2	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA3	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA4	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	S
PA5	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
PA6	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA7	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA8	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
PA9	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
PA10	R	S	S	R	R	R	S	S	S	I	R
PA11	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
PA12	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA13	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S
PA14	S	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S
PA15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
PA16	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA17	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA18	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S
PA19	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
PA20	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
PA21	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
PA22	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
PA23	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA24	R	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA25	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S

PA26	R	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA27	R	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA28	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA29	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
PA30	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA31	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
PA32	R	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S
PA33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
PA34	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S
PA35	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA36	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA37	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
PA38	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
PA39	R	S	S	R	I	R	S	R	S	S	S
PA40	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
PA41	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
PA42	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA43	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S
PA44	S	R	R	R	R	R	I	R	S	I	S
PA45	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA46	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
PA47	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S
PA48	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S
PA49	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
PA50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
PA51	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S
PA52	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA53	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
PA54	R	S	S	R	I	R	S	S	R	R	S
PA55	S	S	R	R	I	R	S	S	S	S	S
PA56	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S
PA57	S	S	S	R	I	R	S	S	R	R	S
PA58	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	S

(S: Duyarlı, I: Orta, R: Dirençli)



Şekil 1. Disk diffüzyon görüntüsü

Tablo 12. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları (Otomatize sistem, Vitek 2 BioMerieux)

İzolat	IMP	MEM	COL	AN	FEP	CAZ	CIP	GN	LEV	NET	PIP
PA1	R- ( $\geq 16$ )	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	I-8	I-16	S- $\leq 0,25$	S- $\leq 1$	S-2	S-2	I-64
PA2	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	R- $\geq 32$	R- $\geq 64$	I-16	R- $\geq 4$	R- $\geq 16$	R- $\geq 8$	R- $\geq 32$	R- $\geq 128$
PA3	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	I-8	I-16	I-0,5	S- $\leq 1$	R-4	S-4	I-64
PA4	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	I-16	R- $\geq 64$	I-0,5	S- $\leq 1$	R-4	S-4	R- $\geq 128$
PA5	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	R- $\geq 32$	R- $\geq 64$	S-0,5	S- $\leq 1$	S-1	S-4	R- $\geq 128$
PA6	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	I-4	I-2	S-0,5	S- $\leq 1$	I-2	S- $\leq 1$	R-32
PA7	R- $\geq 16$	R- $\geq 16$	S- $\leq 0,5$	S- $\leq 2$	I-8	I-16	S- $\leq 0,25$	S- $\leq 1$	S-2	S- $\leq 1$	I-32

<b>PA8</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R->16	R- ≥64	R- ≥64	I- ≤0,2 5	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA9</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R->16	R- ≥64	R- ≥64	S- ≤0,2 5	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA10</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-16	R- ≥64	I-1	S-≤1	R-4	S-4	R- ≥128
<b>PA11</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	R- ≥32	R-16	R->=4	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA12</b>	R- ≥16	R-8	S- ≤0,5	S-≤2	S-4	S-4	S- ≤0,2 5	S-2	S-1	S-4	I-64
<b>PA13</b>	R- ≥16	I-8	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	R-32	I-1	S-4	R-4	S-4	R- ≥128
<b>PA14</b>	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-2	S-0,5	S-4	S-8
<b>PA15</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R->16	R- ≥64	R- ≥64	I-2	R- ≥16	R-4	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA16</b>	R- ≥16	R-8	S- ≤0,5	S-≤2	S-4	S-4	S- ≤0,2 5	S-2	S-1	S-4	I-64
<b>PA17</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R-16	R- ≥64	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,25	S-4	R- ≥128
<b>PA18</b>	R- ≥16	R- ≥16	S-1	S-4	R-16	R-32	R->=4	S-2	R->=8	S-4	R- ≥128
<b>PA19</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-16	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,25	S-4	R- ≥128
<b>PA20</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-16	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,25	S-4	R- ≥128
<b>PA21</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	I-16	R- ≥64	R->=4	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA22</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	I-16	R- ≥64	R->=4	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA23</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	S-8	S-4	I-1	S-2	R-4	S-8	I-32
<b>PA24</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	I-1	S-≤1	R-4	S-2	I-64
<b>PA25</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	I-16	R- ≥64	R->=4	R- ≥16	R->=8	R- ≥32	R- ≥128
<b>PA26</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	I-0,5	S-≤1	R->=8	S-8	I-32
<b>PA27</b>	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	I-1	S-≤1	R-4	S-2	I-64

PA28	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-2	S-0,5	S-≤1	S-2	S-4	I-64
PA29	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-8	I-16	S-2	R-≥4	S-≤1	R-≥8	I-16	R- ≥128
PA30	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,25	S-2	S-8
PA31	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	I-16	R- ≥64	R-≥4	R- ≥16	R-≥8	R- ≥32	R- ≥128
PA32	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	I-0,5	S-≤1	R-≥8	S-8	I-32
PA33	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R-32	R- ≥32	R- ≥64	R-≥4	R- ≥16	R-≥8	R- ≥32	R- ≥128
PA34	I-8	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	I-1	S-≤1	R-4	S-4	R-64
PA35	R- ≥16	I-8	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-4	I-16
PA36	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-4	S-8
PA37	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-4	I-16	R-32	I-2	I-≤1	R-4	I-16	R- ≥128
PA38	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R- ≥32	R- ≥64	R-≥4	R- ≥16	R-≥8	R-8	R- ≥128
PA39	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-8	R-16	I-8	S- ≤0,2 5	R-8	S-1	R-16	R- ≥128
PA40	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R-16	R- ≥64	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-4	R- ≥128
PA41	R- ≥16	I-8	S- ≤0,5	S-≤2	S-8	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-4	S-8
PA42	R- ≥16	I-8	S-2	S-4	S-2	S-2	S-0,5	S-≤1	S-1	S-4	S-8
PA43	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-≤1	S-8
PA44	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-4	S-8	S-2	S- ≤0,2 5	S-4	S-1	R-8	S-8
PA45	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-≤1	S-0,5	S-4	S-8
PA46	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R-16	R- ≥64	R-2	S-≤1	R-≥8	S-2	R- ≥128
PA47	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R-16	R- ≥64	S- ≤0,2	S-≤1	I-2	S-≤1	R- ≥128

							5				
PA48	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	R-≥4	S≤1	R-≥8	S-2	R-64
PA49	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	R-16	I-8	R-≥4	R- ≥16	R-≥8	R- ≥32	R- ≥128
PA50	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	R- ≥64	R- ≥32	R- ≥64	R-≥4	R- ≥16	R-≥8	R- ≥32	R- ≥128
PA51	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	I-8	I-8	R-2	S≤1	R-≥8	S-4	R- ≥128
PA52	R- ≥16	I-8	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S-2	S-1	R-8	I-16
PA53	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S≤1	S-0,5	S-4	S-8
PA54	R- ≥16	I-8	S- ≤0,5	R- ≥64	I-8	I-8	R-≥4	R-8	R-≥8	R-8	I-16
PA55	R- ≥16	I-4	S- ≤0,5	S-≤2	S-2	S-2	S- ≤0,2 5	S≤1	S-0,5	S-4	S-8
PA56	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-8	R-16	S-2	S-0,5	R-8	I-2	R-16	I-16
PA57	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-≤2	R-16	R-16	R-≥4	S≤1	R-≥8	S-2	R-32
PA58	R- ≥16	R- ≥16	S- ≤0,5	S-4	R-16	R-16	R-2	S-4	R-≥8	R-8	R-64

(S: Duyarlı, I: Orta, R: Dirençli)

#### 4.3.2. Gradyent test(E-test) ile MİK değerlerinin belirlenmesi

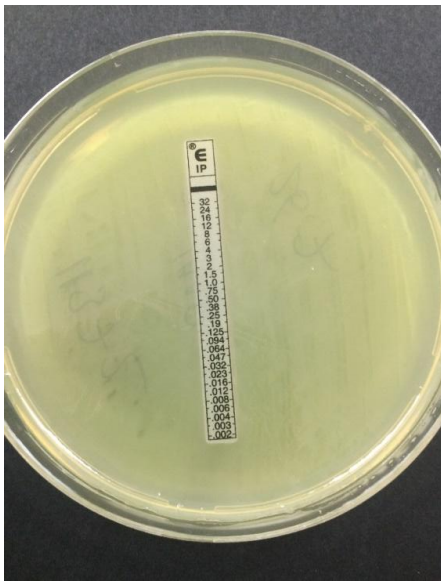
İzolatların imipenem, meropenem ve doripenem için MİK değerlerinin saptanması amacıyla E-test yapıldı (Şekil 2). İmipenem MİK değerleri meropenem ve doripenem MİK değerlerine göre daha yüksek bulunurken, belirlenen MİK değerlerine göre izolatların 17 tanesi meropeneme orta duyarlı, 7 tanesi duyarlı olarak saptandı. Yalnızca bir izolatın imipeneme orta duyarlı olduğu, tüm izolatların doripeneme dirençli olduğu saptandı. Altın standart yöntem olan PZR sonuçları ile Gradyent test sonuçları tabloda verilmiştir (Tablo 13).

**Tablo 13. İzolatların E-Test ile belirlenen MİK değerleri**

İZOLAT	E-TEST			PZR
	IMP	MEM	DOR	
PA1	16	16	4	-
PA2	>32	2	1,5	-
PA3	>32	6	6	-
PA4	>32	6	6	-
PA5	>32	8	2	-
PA6	>32	4	1,5	-
PA7	>32	16	3	-
PA8	>32	>32	2	-
PA9	>32	>32	2	-
PA10	>32	>32	>32	-
PA11	6	8	2	-
PA12	>32	6	3	-
PA13	16	4	3	-
PA14	16	8	4	-
PA15	12	12	8	-
PA16	>32	6	3	-
PA17	>32	16	8	-
PA18	>32	6	3	-
PA19	>32	12	3	-
PA20	>32	12	3	-
PA21	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA22	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA23	>32	>32	1,5	-
PA24	>32	>32	>32	-
PA25	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA26	>32	24	4	-
PA27	>32	>32	>32	-
PA28	8	4	1,5	-
PA29	>32	>32	2	-
PA30	16	1,5	1,5	-
PA31	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA32	>32	24	4	-
PA33	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA34	12	3	1,5	-
PA35	>32	4	3	-
PA36	>32	3	1,5	-



PA37	>32	3	1,5	-
PA38	>32	>32	>32	-
PA39	>32	3	2	-
PA40	>32	6	8	-
PA41	>32	4	3	-
PA42	8	3	1,5	-
PA43	8	1	1,5	<b>GIM</b>
PA44	>32	1,5	4	-
PA45	>32	8	6	-
PA46	>32	12	6	-
PA47	>32	>32	8	-
PA48	>32	12	4	<b>GIM</b>
PA49	>32	>32	4	-
PA50	>32	>32	>32	<b>VIM-1</b>
PA51	>32	>32	8	-
PA52	>32	1,5	1,5	-
PA53	8	2	1,5	-
PA54	>32	1	0,50	-
PA55	>32	4	2	-
PA56	>32	>32	16	-
PA57	>32	>32	8	-
PA58	>32	>32	>32	-



**Şekil 2. Gradyent test görüntüsü (IMP MIK $\geq$ 32 )**

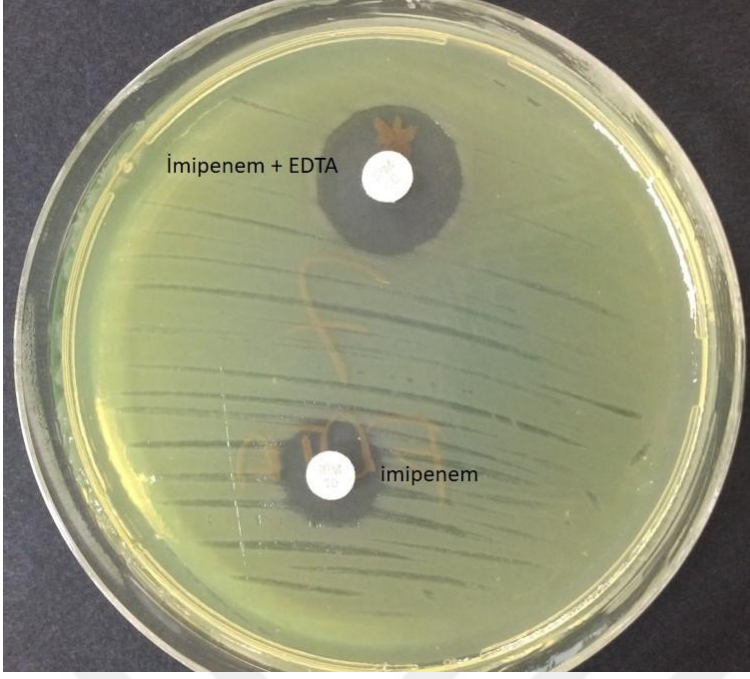
#### 4.4. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Fenotipik Testler ile Araştırılması

Çalışmaya alınan izolatlar kombine disk testi ve metallobeta laktamaz E-test uygulandı (Şekil 3,4). İzolatların 14'ünde (%24,13) E test ile 16'sında (%27) kombine disk ile pozitif bulunmuştur. PZR sonuçları ile KDT ve MBL-E-test sonuçları tabloda 14 ve tablo 15'de gösterilmiştir.

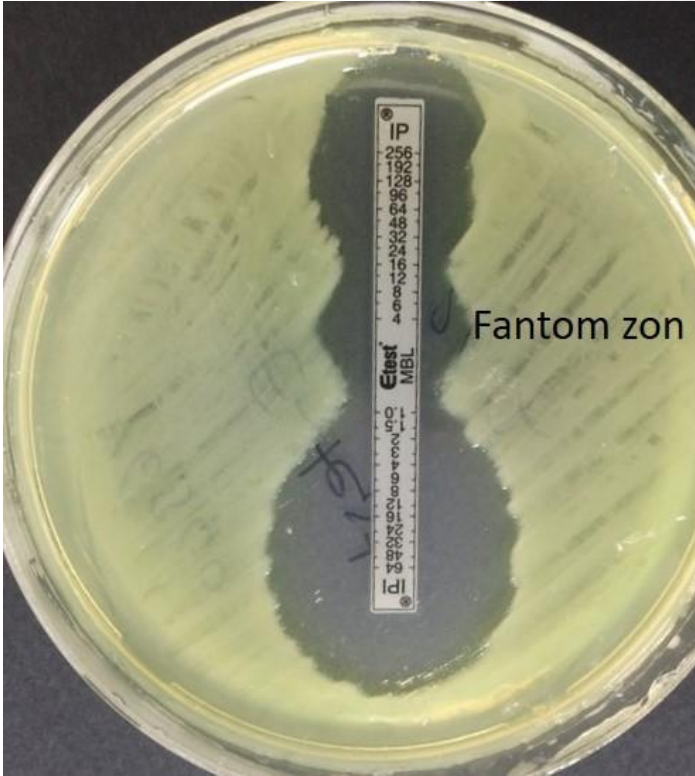
**Tablo 14. Kombine Disk Testi ve MBL E-TEST**

İZOLAT	KOMBİNE DİSK			MBL E-TEST			PZR
	IP	IP+EDTA	MBL indeks	IP	MBL E-TEST	MBL indeks	
PA1	12	21	+	4	1,5	-	-
PA2	13	25	+	8	<1	+	-
PA3	10	19	+	4	1	-	-
PA4	10	19	+	4	1	-	-
PA5	17	29	+	<4	<1	-	-
PA6	13	25	+	8	1	+	-
PA7	13	18	-	8	2	-	-
PA8	12	24	+	16	4	-	-
PA9	12	24	+	16	4	-	-
PA10	14	25	+	12	1	+	-
PA11	16	22	-	4	1,5	-	-
PA12	15	25	+	16	12	-	-
PA13	17	23	-	12	4	-	-
PA14	14	19	-	8	3	-	-
PA15	13	19	-	6	3	-	-
PA16	15	25	+	16	12	-	-
PA17	13	20	+	8	3	-	-
PA18	12	22	+	8	1	+	-
PA19	13	20	+	4	<1	-	-
PA20	13	20	+	4	<1	-	-
PA21	12	24	+	Fantom	Fantom	+	VIM-1
PA22	12	24	+	Fantom	Fantom	+	VIM-1
PA23	13	19	-	6	1,5	-	-
PA24	11	17	-	6	1,5	-	-
PA25	11	24	+	Fantom	Fantom	+	VIM-1

PA26	14	20	-	24	4	-	-
PA27	11	17	-	6	1,5	-	-
PA28	11	17	-	4	1	-	-
PA29	16	25	+	4	<1	-	-
PA30	11	19	+	4	1,5	-	-
PA31	11	24	+	Fantom	Fantom	+	VIM-1
PA32	14	20	-	24	4	-	-
PA33	5	20	+	>32	2	+	VIM-1
PA34	16	20	-	4	1	-	-
PA35	11	20	+	8	<1	+	-
PA36	13	19	-	4	1	-	-
PA37	17	23	-	<4	<1	-	-
PA38	13	23	+	8	3	-	-
PA39	9	19	+	12	8	-	-
PA40	15	25	+	6	1	-	GIM
PA41	13	23	+	12	1	+	-
PA42	14	19	-	6	1	-	-
PA43	13	19	-	4	1,5	-	-
PA44	17	23	-	8	1	+	-
PA45	16	20	-	8	3	-	-
PA46	14	19	-	4	1	-	-
PA47	12	20	+	8	1	+	-
PA48	17	24	+	4	1	+	GIM
PA49	17	22	-	4	3	-	-
PA50	5	22	+	32	12	+	VIM-1
PA51	16	25	+	24	3	+	-
PA52	13	23	+	6	1,5	-	-
PA53	11	17	-	6	1,5	-	-
PA54	17	29	+	6	1	-	-
PA55	10	21	+	12	6	-	-
PA56	15	22	+	6	4	-	-
PA57	12	19	+	8	6	-	-
PA58	7	21	+	24	8	-	-



Şekil 3. Pozitif kombine disk testi görüntüsü



Şekil 4. Pozitif MBL E-test görüntüsü

**Tablo 15. Metallobetalaktamaz fenotipik test sonuçları**

	KDT Pozitif n(%)	KDT Negatif n(%)	MBL E-test Pozitif n(%)	MBL E-test Negatif n(%)
<i>P. aeruginosa</i>	37(63)	21(27)	16(27)	42(73)

#### 4.4.1. Fenotipik Testlerin Karşılaştırılması

Metallobetalaktamaz varlığının araştırılmasında kullanılan fenotipik testler PZR yöntemi ile karşılaştırıldığında; kombine disk testinin duyarlılığı % 87,5, özgüllüğü ise % 40 bulundu( $p=0,237$ ). Metallobetalaktamaz E-testinin ise duyarlılığı % 62,5, özgüllüğü % 82 olarak saptandı( $p=0,015$ , Pearson's  $r$  skoru=0,359).(Tablo16) Kombine disk testinin pozitif prediktif değeri %18, negatif prediktif değeri %95, E-testinin poitif prediktif değeri %43, negatif prediktif değeri %97 olarak hesaplanmıştır.

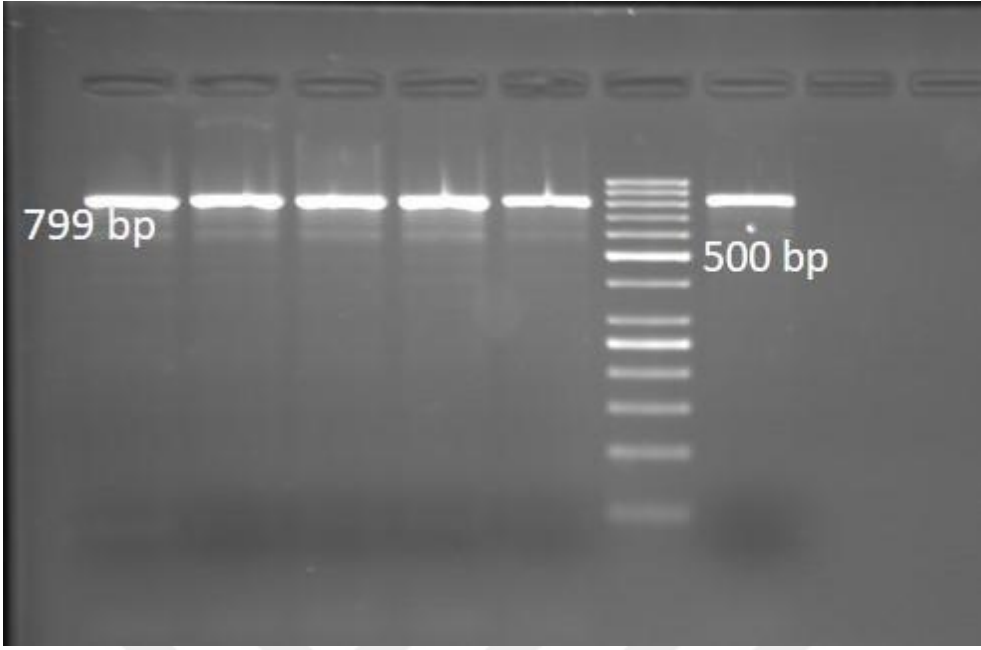
**Tablo 16. MBL fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması**

n(%)		PZR		P	R	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
		+	-				
KDT	+	7(18.9)	30(81.1)	0.237	0.197	87.5	40
	-	1(4,8)	20(95.2)				
MBL E-test	+	7(43.8)	9(56.3)	0.0001>	0.536	87.5	82
	-	1(6.8)	41(93.2)				

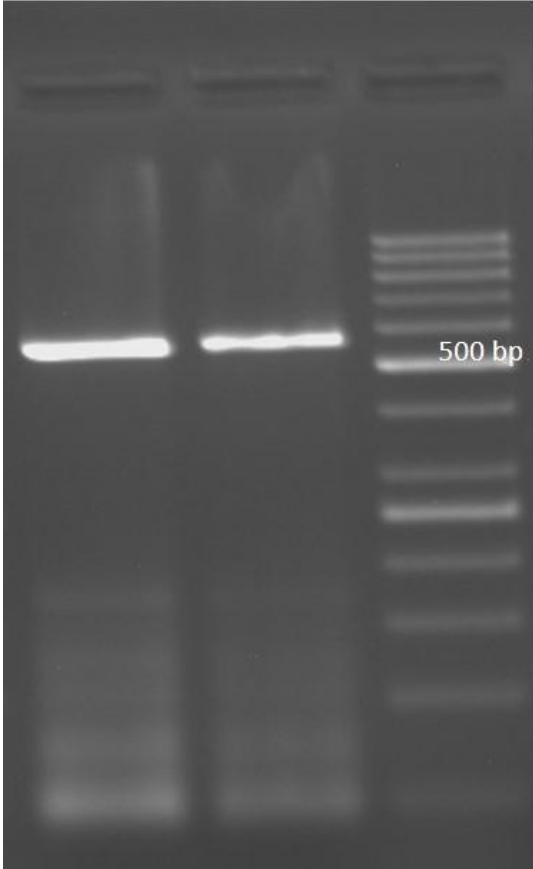
#### 4.5. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması

##### 4.5.1. VIM-1 Geninin PZR ile Araştırılması

VIM-1 genine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 6 izolatta 799 bp büyüklüğünde PZR ürünü tespit edildi (Şekil 5).



**Şekil 5. Pozitif VIM-1 jel görüntüsü**



**Şekil 6. Pozitif GIM jel görüntüsü**

#### 4.5.2. GIM Geninin PZR ile Araştırılması

GIM genine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 2 izolatta 599 bp büyüklüğünde PZR ürünü tespit edildi (Şekil 6).

#### 4.5.3. IMP-1, IMP-2, SPM, OXA-23, OXA-24 Genlerinin PZR ile Araştırılması

Çalışmaya alınan 58 *P. aeruginosa* izolatının, özgül primerler kullanılarak, IMP-1, IMP-2, SPM, OXA-23, OXA-24 genlerine yapılan PZR sonucunda hiç birinde ilgili gen bölgeleri tespit edilmedi.

#### 4.6. Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi

VIM-1 ve GIM gen bölgesi pozitif bulunan örnekler için dizi analizi verileri, kromatografi şeklinde elde edildi. Veriler Chromas DNA dizi analizi programında kromatogram dalgalarının pik uzunlukları kontrol edildi ve düzeltmeler yapıldı. Ayrıca uç kısımlardaki okunamayan diziler kırıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kayıt edildi. VIM-1 ve GIM gen bölgelerine ait dizisi çıkarılan bu gen bölgeleri, PubMed-BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) programına yüklenerek, Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans NCBI dizi verileri ile karşılaştırılarak doğrulamaları yapıldı. Değerlendirmede, bit-score, maksimum identity (karşılaştırmada identik dizilerin sayısı) ve E-değeri (karşılaştırmının istatistiksel anlamı) çıktıları göz önünde bulunduruldu. VIM-GIM genlerinin belirlenmesinde, %96'nın üzerinde en benzer ve anlamlı sonuç veren dizi eşleşmeleri temel alındı. VIM-1 gen bölgesi için gen Bank no: LC169578.1 olan nükleotid dizisi ile %98'in üzerinde, GIM gen bölgesi için ise Bank no: CP008857.1 olan nükleotid dizisi ile %96'nın üzerinde baz eşleşmesi ile doğrulama yapılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

*P. aeruginosa* doğada yaygındır ve hastanede nemli ortamlarda sıklıkla bulunur. Normal insanları kolonize edebilir ve konak savunması yetersiz olanlarda hastalık oluşturmaktadır. Yara ve yanıklarda mavi-yeşil renkte iltihap oluşmasına, nöroşirurjik girişimlerden veya lomber ponksiyondan sonra menenjitte, kateter kaynaklı üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. Antineoplastik ilaç veya radyoterapi uygulanan lösemi, lenfoma hastalarında ve ağır yanıkları olan hastalarda kan dolaşımına geçerek öldürücü sepsise yol açmaktadır<sup>11</sup>.

*P. aeruginosa* pnömoni, üriner sistem, kan akımı, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, otitis eksterna başta olmak üzere toplum kökenli ve hastane kökenli enfeksiyonlarda önemli bir etkindir<sup>1</sup>. Taşbakan ve arkadaşlarının sağlık bakımı ile ilgili pnömoni ile toplum kökenli pnömoni olgularını karşılaştırdıkları çalışmada, sağlık bakımı ile ilgili pnömonilerin % 30.8'inin, toplum kökenli pnömonilerin ise % 12.5'inin *P. aeruginosa* kaynaklı olduğu ortaya konmuştur<sup>63</sup>.

Gram negatif patojenler arasında yüksek morbidite ve mortaliteye (% 20-50) neden olan en önemli hastane enfeksiyonu etkenlerinden biridir<sup>64</sup>. En sık yoğun bakım servisleri, yanık üniteleri, kemoterapi ve radyoterapi üniteleri, organ transplantasyon üniteleri ve yoğun antibiyotik tedavisi uygulanan birimlerde görülmektedir<sup>36</sup>. Tsitsopoulos ve arkadaşları tarafından nöroşirurji kliniğinde yapılan, nozokomiyal kan-dolaşım enfeksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, etkenlerin % 14,8'inin *P. aeruginosa* olduğu saptanmıştır<sup>65</sup>. Türkiye'de Atıcı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonların % 13.8' inin *P. aeruginosa*'ya bağlı olduğu saptanmıştır<sup>66</sup>. Yine Türkiye'de Gedik ve arkadaşlarının, febril nütropenisi olan hastalarla yaptığı çalışmada, enfeksiyonların % 11'inin *P. aeruginosa* kaynaklı olduğu ortaya konmuştur<sup>67</sup>. Alp ve arkadaşlarının yanık hastalarıyla yaptığı başka bir çalışmada ise yanık enfeksiyonlarından en sık izole edilen patojenin *P. aeruginosa* olduğu bildirilmiştir<sup>68</sup>. Karahocagil ve arkadaşlarının yaptığı, hastane enfeksiyon etkenlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise *Pseudomonas*'ın hastane enfeksiyonlarının % 11.6'sından sorumlu olduğu ve bu izolatların % 61.5'inin imipeneme dirençli olduğu bildirilmiştir<sup>69</sup>.



WHO 2013 yılı Türkiye verilerine göre, hastane kaynaklı *Pseudomonas* suşlarının % 45'inin yoğun bakımlardan izole edildiği, karbapenem direnç oranının ise % 33 olduğu bildirilmiştir<sup>70</sup>. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir metaanalizde ise karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'ya bağlı kan dolaşım enfeksiyonlarının ölüm hızı % 8-18.4 olarak bulunmuştur<sup>64</sup>. Çekin ve arkadaşlarının 2012 yılında bildirdiği raporda plastik cerrahi servisi ve cerrahi yoğun bakım, dahili yoğun bakım ve reanimasyon ünitelerinde karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* salgını meydana gelmiş, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasıyla salgının önüne geçilmiştir<sup>71</sup>. Bizim çalışmamızda ise imipenem ya da meropenem orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* en sık (%25.8) dahili kliniklerden, ikinci sıklıkta (%20.6) genel yoğun bakım ünitesinden izole edildi.

Gültepe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hastane kökenli *P. aeruginosa* izolatlarının % 36'sı balgam, % 36'si yara, % 14'ü kan örneklerinden izole edilmiştir<sup>72</sup>. Dündar ve arkadaşlarının çalışmasında ise izolatların % 27'si solunum yolu örneklerinden, % 28'i idrardan, % 27'si deri-yumuşak doku örneklerinden izole edilmiştir<sup>73</sup>. Bizim çalışmamızda örneklerin % 37,9'u solunum yolu % 17'si yara, % 15,5'i idrar örneklerinden izole edilmiştir.

*P. aeruginosa* suşlarının birçok antibiyotiğe doğal ve kazanılmış mekanizmalar ile direnç geliştirmesi bu enfeksiyonların tedavisinde sorun oluşturmaktadır. Karbapenemler penisilin bağlayan proteinlere yüksek afinite göstermesi, GSBL'ye karşı stabilitesi ve dış membrandan kolay geçebilmesi ile *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili beta laktamlardır<sup>74</sup>. *P. aeruginosa*'da karbapenem direnci metallobetalaktamaz salınımı, *P. aeruginosa*'nın porin proteini olan oprD'nin kaybı ve effluks sistemi ile ilacın dışarı atılmasıyla gerçekleşmektedir. Bunlardan karbapenemaz salınımı, bu enzimleri kodlayan genlerin plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla aktararak izolatlar arasında yayılması nedeniyle önem taşımaktadır. Dünya çapında *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında karbapenem direncinin giderek artması ve karbapenemazların suşlar arasında aktarılması tedavide güçlükler neden olmaktadır<sup>76</sup>. Karbapenemlere dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında akut böbrek hasarı gibi ciddi yan etkileri olan kolistin son seçenek olarak kullanılmaktadır<sup>77</sup>.

Ding ve arkadaşlarının yaptığı metaanalizde, hastane kaynaklı pnömonilerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının % 22.2'sinin amikasinine, % 42.4'ünün gentamisine, % 35.3'ünün sefepime, % 34.3'ünün seftazidime, % 47.9'unun piperasiline, % 22.9'unun imipeneme, % 35.7'sinin meropeneme dirençli olduğu saptanmıştır<sup>78</sup>. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen hemokültür örneklerinden izole edilen 46 *P. aeruginosa* suşunun %10'u amikasinine, %41.3'ü aztreonama, %97.8'i sefotaksime, %17.4'ü seftazidime, %39.1'i siprofloksasine, %17.3'ü gentamisine, %26'sı imipeneme, %23.9'u meropeneme, %15.2'si piperasilin/tazobaktama dirençli bulunmuştur<sup>79</sup>. Bayram ve arkadaşlarının 179 yanık hastasıyla yaptığı başka bir çalışmada ise izolatların % 21'sinin amikasinine, % 36'sının gentamisine, % 25'inin sefepime, % 32'sinin seftazidime, % 46'sının imipeneme, % 19'unun meropeneme dirençli olduğu ortaya konmuştur<sup>30</sup>.

Hastanemizde 2015 yılında izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının % 9.1'i amikasinine, % 11.7'si gentamisine, % 12.2'si sefepime, % 12.5'i seftazidime, % 21.1'i piperasiline, % 15.3'ü piperasilin-tazobaktama, % 15.8'i siprofloksasine, % 25.7'si levofloksasine % 24.7'si imipeneme ve %26.2'si meropeneme dirençli bulunmuştur. Çalışmaya aldığımız karbapenemlere dirençli 58 izolatın otomatize sistem ile 13 (%22)'inin amikasinine, 16 (%29)'sinin gentamisine, 19 (%32)'sinin sefepime, 23 (%39)'unun seftazidime, 33 (%56)'sının piperasiline, 18 (%31)'sinin siprofloksasine, 32 (%55)'inin levofloksasine dirençli olduğu saptanmıştır. Hastanemizden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında kolistine direnç saptanmamıştır.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) karbapenemlere dirençli veya az duyarlı izolatların farklı bir yöntemle doğrulanmasını önermektedir<sup>81</sup>. Bizim çalışmamızda da karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla E-test uygulanmıştır. E-test ile imipenem için duyarlılık sonuçları disk difüzyon ve otomatize sistem ile aynı bulunmuştur. Fakat meropeneme 34 suş dirençli, 17 suş orta duyarlı, 7 suş duyarlı bulunmuştur. Ülkemizde Ögünç ve arkadaşlarının BD Phoenix otomatize sistemiyle imipenem ve meropeneme dirençli veya az duyarlı saptanan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının imipenem-meropenem duyarlılıklarını disk difüzyon, E-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırdıkları çalışmada, BD Phoenix sistemi ile imipenem ve/veya meropeneme az duyarlı veya dirençli saptanan 51 *P.*

*aeruginosa* izolatının tümü sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile az duyarlı veya dirençli olarak saptanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans olarak alındığında E-test % 98 uyumlu bulunmuştur<sup>82</sup>. Yine ülkemizde Kulah ve arkadaşları çalışmalarında, *A. baumannii* suşlarında imipenem direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin performansını sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. Sıvı mikrodilüsyonla 87 (%78)'si imipenem dirençli saptanan izolatlarda Vitek 2, BD Phoenix, E-test ile benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen E-testin 2 minör hatayla en iyi performansı gösterdiği ortaya konmuştur<sup>83</sup>.

MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojisinin irdelendiği Hong ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir derlemede, Türkiye'nin de aralarında olduğu 50 ülkeden toplanan veriler incelenmiştir. *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç oranının en düşük olduğu ülkelerin Kanada ve Dominik Cumhuriyeti (sırayla % 3, % 8), en yüksek olduğu ülkelerin ise Brezilya, Peru, Kosta Rika, Rusya, Yunanistan, Polonya, İran, ve Suudi Arabistan (% 50-75.3) olduğu saptanmıştır<sup>74</sup>. 2011 yılında yayınlanan, ülkemizin de dahil olduğu 21 Avrupa ülkesinin katıldığı Avrupa bölgesel antimikrobiyal süveyans raporuna göre ise *P. aeruginosa* izolatlarının % 21'i imipeneme, % 17.4'ü meropeneme dirençli bulunmuştur<sup>85</sup>. WHO 2013 yılı Türkiye verilerine göre ise ülkemizde hastane kaynaklı *Pseudomonas* suşlarının karbapenem direnç oranının % 33 olduğu bildirilmiştir<sup>70</sup>. Hastanemizde 1 Ocak-31 Aralık 2015 tarihleri arasındaki 1 yıllık süreçte toplam 392 hastadan 720 *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Tekrarlayan izolatlar dışlanıp, her bir hastanın ilk üreyen izolatı değerlendirildiğinde bunların % 24.7'si imipeneme, %26.4'ü meropeneme dirençli bulunmuştur.

*P. aeruginosa*'da karbapenem direnci birkaç mekanizmayla gerçekleşmektedir. Bunlar *P. aeruginosa*'nın porin proteini olan oprD'nin kaybı, effluks sistemi ve metallobetalaktamaz salınımıdır<sup>76</sup>. MBL ise karbapenemleri ve monobaktamlar dışında tüm beta laktamları hidrolize eden enzimlerdir. En sık görülen IMP ve VIM dışında SPM, GIM, SIM, KHM, NDM, AIM, DIM, SMB, TMB, FIM gibi tipleri de içermektedir. Şu anda IMP'nin bilinen 55 varyantının 33'ü, 46 VIM varyantının 24'ü *P. aeruginosa*'da gösterilmiştir. Bununla birlikte VIM-2 *P. aeruginosa*'da en sık saptanan MBL varyantıdır<sup>74</sup>.

MBL enzimi varlığının gösterilmesinde PZR altın standart yöntem olsa da, pahalı oluşu ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle rutin uygulamalarda sık kullanılmamaktadır. Bu nedenle MBL varlığının gösterilmesinde fenotipik testlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Kombine disk testi, çift disk sinerji testi, Modifiye Hodge testi ve MBL gradient test bu amaçla kullanılmaktadır<sup>58,47</sup>. İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi, MBL tespitinde kullanılan beta laktam ajanlar ile metal şelatörlerin sinerjistik etkisinin gözlemlenmesine dayalı fenotipik testlerden biridir. Young D ve arkadaşlarının PZR pozitif izolatlarla yaptığı çalışmada, 0.5 M EDTA solüsyonu eklenerek yapılan kombine disk testinin duyarlılığının yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır<sup>60</sup>. Moosavian ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, PZR ile 67'sinde MBL geni saptanan 122 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 110'unda KDT ile pozitiflik saptamışlardır<sup>29</sup>. Walsh ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada MBL E-testin MBL'nin fenotipik tayinindeki duyarlılığını %94 ve özgüllüğünü %95 olarak belirlemişlerdir<sup>47</sup>. Farajzadeh ve arkadaşları toplam 223 *P. aeruginosa* izolatı ile yaptıkları çalışmada ise kombine disk testinin duyarlılığını % 100, özgüllüğünü % 47, MBL E-testin ise duyarlılığını % 100, özgüllüğünü % 24 olarak bulmuşlardır<sup>85</sup>. Rojo-Bezares ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 123 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatına MBL E-test ve çift disk sinerji testi ile MBL fenotipik testleri yapılmıştır. PZR ile VIM-2 gen bölgesi pozitif bulunan 123 izolatta fenotipik testler ile % 49 oranında pozitiflik saptanmıştır<sup>86</sup>. Gupta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise KDT ile MBL E-testin benzer oranda etkili olduğu fakat maliyet açısından KDT'nin rutin hizmet veren laboratuvarlarda kullanımının daha uygun olacağını belirtmişlerdir<sup>87</sup>.

Ülkemizde Bayraktar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yoğun bakımlardan izole edilen karbapeneme dirençli 27 *P. aeruginosa* izolatının MBL E-test ile 17 (%62)'sinde pozitiflik saptanmıştır<sup>88</sup>. Çetin ve arkadaşlarının imipeneme dirençli 61 *A. baumannii* ve 52 *P. aeruginosa* kökeninde MBL üretimi kombine disk, çift disk sinerji ve MBL E test fenotipik yöntemleri ile araştırdığı çalışmada, *P. aeruginosa* izolatlarının KDT ile 32'sinde (%63), MBL E-test ile 21'inde (%40), *A. baumannii* izolatlarının ise KDT ile 46'sında (%75), MBL E-test ile 49'unda (% 80) pozitiflik saptamışlardır<sup>8</sup>. Öztürk ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, MBL E-test ile imipeneme dirençli 18 *P. aeruginosa* suşunun 5'inde (%28) MBL varlığı gösterilmiştir<sup>89</sup>. Elazığ'da yoğun

bakımlardan izole edilen 43 karbapenem dirençli izolatla yapılan çalışmada, izolatların 34'ü (% 79) KDT ile pozitif bulunmuştur<sup>7</sup>. Yine Elazığ'da MBL üretiminin fenotipik testler ile araştırıldığı bir çalışmada, Bulut ve arkadaşları, meropenem dirençli 10 *P. aeruginosa* suşunun KDT ile 8'inde (%80) ve MBL-E test ile 6'sında (%60), meropenem dirençli 40 *A. baumannii* suşunun ise KDT ile 38'inde (%95), MBL-E test ile 39'unda (% 97.5) pozitiflik bulmuştur<sup>90</sup>. Özgümüş ve arkadaşlarının en az bir karbapenem dirençli olduğu doğrulanan 33 *P. aeruginosa* izolatı ile yaptığı çalışmada, MBL E-test ile izolatların 29 (%88)'unda MBL üretimi saptanmıştır<sup>91</sup>. Hastanemizde 2011 yılında yapılan bir çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olduğu düşünülen 29 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL varlığı fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılmış, MBL E-testle izolatların 6'sı (%20.7) pozitif bulunmuştur<sup>92</sup>.

MBL tayini için çeşitli fenotipik testler denenmiş olmasına karşın özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek standart bir yöntem belirlenememiştir. Bu durum araştırmacıları MBL tayininde; PZR ve nükleotid sekans analizi gibi özgüllüğü ve duyarlılığı çok daha yüksek ancak uzmanlık gerektiren, maliyeti yüksek olan moleküler yöntemlerin kullanılmasına yöneltmiştir<sup>47</sup>.

2012-2014 yılları arasında, Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 40 ülkenin katılımıyla *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* izolatlarında MBL insidansının ve global dağılımının araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya 38.266 *Enterobacteriaceae* ve 8.010 *P. aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. *Enterobacteriaceae* izolatlarının 163 (% 0.4)'ünde ve *P. aeruginosa* izolatlarının 308 (% 3.8)'inde MBL genleri bulunduğu, MBL genleri pozitif bulunan *P. aeruginosa* izolatlarının % 99'unun meropenem dirençli olduğu belirtilmiştir. *P. aeruginosa*'da pozitif bulunan genlerin ise % 87.7'sinin VIM, % 11'inin IMP, % 1'inin NDM olduğu, en sık rastlanan VIM varyantının VIM-2 olduğu saptanmıştır<sup>93</sup>. 2015 yılında İran'da 122 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatıyla yapılan bir çalışmada MBL genlerinin varlığı araştırılmış, izolatların 2 (%1.6)'sinde VIM-2, 67 (%54)'sinde IMP-1 geni pozitif bulunmuştur<sup>29</sup>. Yine İran'da yapılan başka bir çalışmada, 107 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 14'ünde (%13) IMP-1, 10'unda (%9) VIM-1 geni bulunmuştur<sup>94</sup>. Fournier ve arkadaşlarının 109 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatıyla yaptığı, karbapenem direnç mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, 1 tane VIM-1(%0.9), 4 VIM-2 (%3.6), 1 VIM-4 (%0.9) ve 1 IMP-29 (%0.9) gen bölgesi

pozitif saptanmış, izolatların 94 (%86) 'ünde ise Opr D porin proteinin azaldığı ortaya konmuştur<sup>95</sup>. Polonya'da Kosykowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, transplantasyon ünitesinden izole edilen 22 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 15 (% 68)'inde VIM geni saptanmıştır<sup>96</sup>. Merajdi ve arkadaşlarının yanık hastalarından izole ettiği 30 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 6 (%20) 'sında VIM-4, 1 (%3)'inde VIM-2 geni saptanmıştır<sup>97</sup>. Shirani ve arkadaşları immunsuprese hastalardan izole edilen 96 karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatının % 28.1'i IMP, % 5.2'si VIM ve %3.1'i hem IMP hem VIM pozitif bulunmuştur<sup>98</sup>. Al-Agamy ve arkadaşları 34 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 12 (%35) 'sinde VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-11, VIM-28 ve IMP-7 genlerini pozitif bulmuş, 9 (%26) izolatta Opr D kaybı, 5 (%14) izolatta ise effluks proteini artışı saptamışlardır<sup>99</sup>.

2004 yılında Bahar ve arkadaşları tarafından *P. aeruginosa* izolatında saptanan VIM-5, ülkemizde ilk tespit edilen MBL'dir<sup>6</sup>. Yine ülkemizde 2007 yılında Yakupoğulları ve arkadaşları tarafından VIM-2 ve PER-1 eksprese eden bir *P. aeruginosa* izolatı tanımlanmıştır<sup>100</sup>. 2007 yılında Özgümüş ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir çalışmada ise 100 *P.aeruginosa* izolatından 1'inde VIM (%1), 9'unda IMP (%9) olmak üzere toplam 10 izolatta MBL saptanmıştır<sup>101</sup>. 2008 yılında Aktaş ve arkadaşlarının PZR ile MBL varlığını araştırdığı çalışmada karbapeneme dirençli 28 *P. aeruginosa* ve 11 *A. Baumannii* izolatlarında VIM ve IMP gen bölgelerine rastlanmamıştır<sup>102</sup>. Yine Mansur ve arkadaşlarının Malatya'da yaptığı çalışmada, karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatının hiçbirinde MBL gen bölgelerine rastlanmamıştır<sup>103</sup>. Yılmaz ve arkadaşları 38 karbapenem dirençli izolatın 7 (%18)'sinde VIM-2, 1 (%2) 'inde ise IMP-9 tipi MBL saptamışlardır<sup>104</sup>. Er ve arkadaşlarının Muş ilinde, 95'i karbapeneme dirençli toplam 195 *P. eruginosa* izolatı ile yaptığı çalışmada, 4 izolatta (%2) VIM-2, 2 (%1) izolatta IMP-1, 26 (%13) izolatta GES-1 pozitifliği saptanmıştır<sup>105</sup>. Malkoçoğlu ve arkadaşlarının 84 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatı ile yaptığı çalışmada KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48, ve GES genlerinin varlığı araştırılmış, 1 (%1.1)'er izolatta VIM-1, VIM-2 ve GES-5 pozitifliği saptanmıştır<sup>75</sup>. Hastanemizde yapılan bir çalışmada ise, hastane enfeksiyonu etkeni olduğu düşünülen 29 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL genlerinin varlığı araştırılmış, izolatların 11'inde (%37.9) VIM-1 gen bölgesi pozitif bulunmuştur<sup>92</sup>.

Bahsi geçen son yıllarda yapılmış olan uluslararası çalışmalarda MBL genlerinin pozitiflik oranları % 0.9 ile % 68 arasında değişkenlik göstermektedir<sup>29,94,95,96,97,98,99</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bazı bölgelerde MBL genlerine hiç rastlanmazken bazı bölgelerde % 37.9 gibi yüksek oranlarda saptandığı görülmüştür<sup>75,92,101,102,103,104,105</sup>.

Daha önce yapılan ulusal çalışmalar ve hastanemizde yapılan çalışma ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da PZR ile izolatların % 13.7'sinde MBL genlerinin varlığı saptanmış olup, en sık görülen MBL varyantı VIM olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, diğerlerinden farklı olarak 2 izolatta GIM geni pozitif bulunmuştur.

GIM (German imipenemase) ilk kez 2004'te Almanya'da *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter pittii*'de de varlığı gösterilen bu genin plazmidler üzerinde taşındığı fakat aktarılabılır olmadığı gösterilmiştir<sup>106</sup>. Wendel ve arkadaşlarının bir hastane salgınından izole edilen 230 karbapenem duyarlı olmayan Gram negatif izolatla yaptığı çalışmada, 50 izolatta (33 *P. aeruginosa*, 7 *Enterobacter cloacae*, 5 *Pseudomonas putida*, 2 *Serratia marcescens*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella oxytoca* 1 *Citrobacter freundii*) GIM geni varlığını göstermişlerdir<sup>107</sup>. Türkiye'de yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'da GIM geni gösterilememiştir. Mevcut literatür bilgileri ışığında *P. aeruginosa*'da GIM geninin gösterildiği ilk çalışmadır.

Karbapenem direncinden metallobetaaktamazların yanısıra moleküler sınıf D'de yer alan karbapenemleri hidrolize eden oksasilinaz enzimleri de sorumlu tutulmaktadır. İran'da sınıf A ve D betalaktamaz varlığını araştırdığı bir çalışmada, 50 impenem dirençli *Pseudomonas* izolatının 7 (14%)'sinde PER, 18 (36%)'inde OXA-10, 18 (36%)'inde TEM ve 18 (36%)'inde SHV genleri pozitif bulunmuştur<sup>108</sup>. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise *Pseudomonas* suşlarında karbapenemaz üretimine neden olan OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 genlerinin varlığı araştırılmış, 184 karbapenem dirençli *Pseudomonas* izolatının 12 (%6.5)'sinde OXA-23, 1 (%0.54)'inde OXA-40 ve 1 (%0.54)'inde OXA-58 varlığı tespit edilmiştir<sup>109</sup>. Bizim çalışmamızda ise OXA-23, OXA-24 gen bölgeleri negatif bulunmuştur.

Çalışmamızda gen bölgesi pozitif bulunan örneklerle dizi analizi uygulanmıştır. Kromatografi şeklinde elde edilen DNA dizi analizi verileri,

PubMed-BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) programında referans NCBI dizi verileri ile karşılaştırılarak gen bölgelerinin doğrulanması yapılmıştır. Dizi analizinin uygulanması elde edilen pozitifliklerin doğrulanması açısından önemlidir. Er ve arkadaşları 92'si meropeneme dirençli toplam 195 seftazidime dirençli *P. aeruginosa* izolatu ile yaptıkları çalışmada PZR ile izolatların 113'ünde (%57.9) GES, 9'unda (%4.6) OXA, 4'ünde (%2) VIM, 2'sinde (%1) IMP direnç gen bölgesinin varlığını göstermişlerdir. Pozitif bulunan örneklere dizi analizi uygulandığında ise OXA geni saptanan 9 izolatın 5'i OXA-10, 4'ü OXA-14; VIM geni saptanan 4 izolatın hepsi VIM-2; IMP geni saptanan 2 izolatın hepsi IMP-1 olarak tanımlanmış, GES pozitif bulunan 113 izolatın ise 26'sı GES-1 olarak tespit edilmiş, diğer 87 izolatta aynı primerle saptanabilen ve dizi analizi sonucu ayrımı yapılabilen ABC taşıyıcı permeaz (transporter permease) gen bölgesi bulunmuştur<sup>105</sup>.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, 2015 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 58 imipenem ve/veya meropeneme orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL sıklığının ve tiplerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmanın neticesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları en sık (%25.8) dahili klinikler, ikinci sıklıkta (%20.6) genel yoğun bakım ünitesi ve daha az sıklıkta diğer kliniklerden izole edilmiştir.
2. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları sırasıyla trakeal aspirat (% 29.3), yara (% 17.2), üriner sistem (% 15.5), balgam (%8.6), cilt ve yumuşak doku (% 8.6) ve azalan sıklıkta diğer klinik örneklerden izole edilmiştir.
3. Hastanemizde *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin yaklaşık %25 olduğu görülmüştür.
4. Karbapenemlere dirençli 58 *P. aeruginosa* izolatınının 13 (%22)'i amikasine, 16 (%29)'sı gentamisine, 19 (%32)'sı sefepime, 23 (%39)'u seftazidime, 33 (%56)'sı piperasiline, 18 (%31)'i siprofloksasine, 32 (%55)'si levofloksasine dirençli bulunmuştur.
5. Kombine disk testiyle MBL üretimi açısından izolatların %63'ünde pozitiflik saptanmıştır.
6. MBL E-test ile MBL üretimi açısından izolatların % 27'sinde pozitiflik saptanmıştır.
7. PZR ile izolatların 6 (%10)'sında VIM-1, 2(%3.4)'sinde GIM tipi MBL varlığı saptanmıştır.
8. İzolatların hiç birinde PZR ile IMP-1, IMP-2, VIM-2, SPM tipi MBL gen bölgesi ve sınıf D oksasilinaz enzimi kodlayan OXA-23, OXA-24 gen bölgesi saptanmamıştır.
9. PZR ile karşılaştırıldığında KDT'nin duyarlılığı % 87.5, özgüllüğü % 40 olarak hesaplanmıştır.
10. PZR ile karşılaştırıldığında MBL E-testin duyarlılığı % 87.5, özgüllüğü % 82 olarak hesaplanmıştır.

11. MBL pozitif olan ancak gen bölgesi tespit edilemeyen suşlarda çalışmada araştırılmayan diğer gen bölgelerinin sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; *P. aeruginosa*'da karbapenem direnci tedavi seçeneklerini kısıtladığından ve direnç suşları arasında aktarılabilir olduğundan hastanelerde antibiyotik duyarlılık sonuçlarının ve direnç mekanizmalarının takip edilmesi önemlidir. MBL varlığının hızlı ve güvenilir metotlarla laboratuvarında tespit edilmesi bu suşların hastanede yayılımını önlemek için uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasını sağlayacaktır. Bu amaçla *P. aeruginosa*'da MBL tespiti için özgüllük ve duyarlılığı yüksek olduğundan MBL E-test önerilebilir. Buna sebep olan direnç genlerinin araştırılmasında epidemiyolojik verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Ülkemizde karbapenem direncinden sorumlu diğer mekanizmaların moleküler yöntemlerle araştırıldığı çalışmaların da gerekli olduğu görülmüştür.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Erdem B. Pseudomonaslar. Ustaçelebi Ş (editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. s.551-8.
2. Çiragil P. Pseudomonas ve İlişkili Bakteriler. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier. 2008: 333-338.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Klinik mikrobiyoloji 9.baskı; 2007;48:734-48.
4. Üstün C. Hastane Kökenli Karbapenem Dirençli ve Duyarlı Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları. ANKEM Derg 2010;24(1):1-6.
5. Dong F, Xu XW, Song WQ et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas Aeruginosa isolates from a paediatric clinic in China. Chinese Medical Journal 2008;121(17),1611-1616.
6. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate from Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2004;54: 282-283.
7. Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun Bakımda İzole Edilen Pseudomonas Spp. Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığının Araştırılması. ANKEM Derg 2011;25(3):150-156,
8. Çetin ES, Tetik T, Kaya S, Arıdoğan BC. Acinetobacter Baumannii Ve Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Dört Farklı Fenotipik Yöntemle Araştırılması. İnfeksiyon Derg 2009; 23 (2): 51-55.
9. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clinical Microbiology Reviews 2009;22(4): 582–610.
10. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. Environmental Microbiology 2010; 12: 1377-83.
11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria. In: Brooks GF,

- Carroll KC, Butel JS, Morse SA, ed(s). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies. 2014:263-267.
12. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir, Barış Yayınevi, 2000:175-187.
  13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The nonfermentative Gram-negative bacilli. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Ed. E.W. Koneman, S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. Lippincott, Philadelphia-New York, 2006, 316-353.
  14. Blondel EH, Henry DA, Speert DP. Pseudomonas. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM press; 2007.p.734-48.
  15. Bergagne E. Pseudomonas and miscellaneous gram negative bacilli. In: Infectious Diseases. Edited by Colman J, Powerdyly GW, Second ed. edn. Toronto; 2004: 1733-1748.
  16. Pier G, Ramphal R. Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition, Elsevier, Philadelphia.2009; 2: 2835- 60.
  17. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa – a review. Gene 1997;192: 99–108.
  18. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular Mechanisms of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli Biofilm Formation. Pathogens 2014; 3: 596-632.
  19. Pitt TL, Simpson AJH: Pseudomonas and Burkholderia spp. In Gillespie SH, Hawkey PM (Eds.): Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley and Sons Ltd, UK; 2th ed, 2006, pp. 427-435.
  20. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, and Wiener-Kronish JP. Association between Pseudomonas aeruginosa type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. Critical Care 2014;18(6):668.
  21. van 't Wout EF, van Schadewijk A, van Boxtel R et al. Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. PLoS Pathog 2015; 17:11(6).

22. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30:1159–1168.
23. Moker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules. *Journal Of Bacteriology* 2010;192(7):1946–1955.
24. Vahaboğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. In Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* 3.baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 2008:2177-2186.
25. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 112: 1460-1465.
26. Lee J, Zhang L. Review: The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2015; 6(1):26–41.
27. Hill EB, Herry DA, Speert DP. *Pseudomonas* (çev. B Şener). A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Ed): *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology-çeviri)*'de. Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1: s. 734-748.
28. Cerceo E, Deitelzweig SB, Sherman BM, Amin AN. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microb Drug Resist* 2016; 22(5):412-431.
29. Moosavian M, Rahimzadeh M. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes, bla IMP-1, bla VIM-2 and bla SPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. *Iran J Microbiol* 2015; 7(1):2-6.
30. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58: 1133–1148.
31. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Son erişim:27.10.2016.

32. Dündar D, Sönmez Tamer G. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antimikrobiyal Direnci: Üç Yıllık Değerlendirme. ANKEM Derg 2009;23(1):17-21.
33. Llano-Sotelo B, Azucena EF Jr, Kotra LP et al. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. Chem Biol. 2002; 9(4): 455-63.
34. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001;7(2): 337-41.
35. Moya B, Dötsch A, Juan C et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. PLoS Pathog. 2009; 5(3).
36. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. Clinical Infectious Diseases 2002;34(5): 634–640.
37. Gülay Z. Antibiyotik direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve karbapenemlere direnç. Hastane enfeksiyonları dergisi 2001;5(3) :210-229.
38. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: A Clinical Update. Clin Microbiol Rev 2005; 18 (4): 657–86.
39. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39(6):1211-1233.
40. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980;289(1036):321-331.
41. Gür D.  $\beta$  - Laktamazlar, Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2):102-109.
42. Livermore DM. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance, Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
43. Bajaj P, Singh NS, Viridi JS. *Escherichia coli*  $\beta$ -Lactamases: What Really Matters. Front Microbiol 2016;30;7:417.
44. Yuluğ N. Beta-Laktamazlar ve Klinik Açısından Önemi, ANKEM Dergisi 1997; 11:205-5.
45. Danel F, Hall LMC, Gür D et al. Transferable Production of PER-1 Beta-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob Chemother 1995; 35:281-94.

46. Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L, et al. Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins, Caused By PER-1 Beta-Lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol* 1995; 43:294-9.
47. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18: 306–325.
48. Bush K. Metallo- $\beta$ -lactamases; a class apart. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):49-53.
49. Zar H, Saiman L, Quittel L. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *Journal of Pediatrics* 1995; 126: 230-233.
50. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43:1584-1590.
51. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect. Dis* 2000;6:84-85.
52. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$  lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams?. *Lancet Infectious Diseases* 2011; 11: 381–93.
53. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA et al. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:582-587.
54. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004;48:4654-4661.
55. Queenen AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$  lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007;20: 440-458.
56. Lee K, Chong Y, Shin HB et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection* 2001;7: 88-91.

57. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement, 2010, M100-S20. CLSI.
58. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG et al. Phenotypic Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The ScientificWorld Journal 2012;2012:654939.
59. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 01.01.2015 / Sürüm: 1.1 / B-TP-24/ Test Prosedürleri / Bakteriyoloji.
60. Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40;(10) 3798-801.
61. Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(12):4329-35.
62. Kazi M, Nikam C, Shetty A et al. Dual-tubed multiplex-PCR for molecular characterization of carbapenemases isolated among *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology 2015;118: 1096-1102.
63. Taşbakan MS, Bacakoğlu F, Başoğlu OK ve ark. The comparison of patients with hospitalized health-care-associated pneumonia to community-acquired pneumonia. Tuberk Toraks 2011;59(4):348-54.
64. Zhang Y, Chen XL, Huang AW et al. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. Emerg Microbes Infect 2016; 23:5.
65. Tsitsopoulos PP, Iosifidis E, Antachopoulos C et al. Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. Acta Neurochir 2016;158(9):1647-54.
66. Atici S, Soysal A, Kepenekli KE ve ark. Healthcare-associated infections in a newly opened pediatric intensive care unit in Turkey: Results of four-year surveillance. J Infect Dev Ctries 2016;10(3):254-9.



67. Gedik H, Şimşek F, Yıldırım T ve ark. Which Multidrug-Resistant Bacteria are Emerging in Patients with Hematological Malignancies?: One-Year Report. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015;1:51-6.
68. Alp E, Coruh A, Gunay GK ve ark. Risk factors for nosocomial infection and mortality in burn patients: 10 years of experience at a university hospital. *J Burn Care Res* 2012;3:379-85.
69. Karahocagil M, Yaman G, Göktaş U ve ark. Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi* 2011;18 (1):27-32.
70. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0006/285405/CAESAR-Surveillance-Antimicrobial-Resistance2014.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/285405/CAESAR-Surveillance-Antimicrobial-Resistance2014.pdf).
71. Cekin Y, Karagöz A, Kızılateş F ve ark. Evaluation of a hospital outbreak related to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(4):619-27.
72. Gültepe B, Iraz M, Ceylan A ve ark. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Direnci. *ANKEM Derg* 2014;28(1):32-36.
73. DüNDAR D, Sönmez TG. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antimikrobiyal Direnci: Üç Yıllık Değerlendirme. *ANKEM Derg* 2009;23(1):17-21.
74. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47(2):81-97.
75. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B et al. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist* 2016.
76. Cacci LC, Chuster SG, Martins N et al. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;111(9):551-8.
77. Hu YF, Liu CP, Wang NY et al. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis* 2016;16(1):444.

78. Ding C, Yang Z, Wang J et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2016;49:119-28.
79. Güney M, Bedir O, Kılıç A ve ark. GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Hemokültür Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Direnç Durumları. *Gülhane Tıp Derg* 2011; 53: 119-122
80. Bayram Y, Parlak M, Aypak C ve ark. Three-year review of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van, Turkey. *Int J Med* 2013;10(1):19-23.
81. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5810a4.htm>. Son erişim: 27.10.2016.
82. Oğünç D, Ongüt G, Ozen NS ve ark. Shall we report the carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains detected by BD Phoenix system?. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):197-202.
83. Kulah C, Aktas E, Comert F ve ark. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis* 2009;9:30.
84. Jones RN, Flonta M, Gurler N ve ark. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78(4):429-36.
85. Farajzadeh Sheikh A, Rostami S, Jolodar A et al. Detection of Metallo-Beta Lactamases Among Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7(11).
86. Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol* 2014;304(3-4):405-14.
87. Gupta V, Sidhu S, Chander J. Metallo-  $\beta$  - lactamase producing nonfermentative gram-negative bacteria: an increasing clinical threat among hospitalized patients. *Asian Pac J Trop Med* 2012;5(9):718-21.

88. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Metallobetalaktamaz Üretimini Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34:248-252
89. Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci Ve Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığı. *ANKEM Derg* 2011;25(1):42-47
90. Bulut Y, Çağlar H. Gram Negatif Non-fermantatif Bakterilerde Metallo-Beta-Laktamaz Enziminin Farklı Yöntemlerle Gösterilmesi. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg* 2013; 27 (3): 135 – 140.
91. Özgümüş S, Aydın ÖA, Kuvat N ve ark. Nozokomiyal *Pseudomonas* Suşlarında Metallo- $\beta$ -Laktamaz Üretimini Fenotipik Olarak Araştırılması. *Klimik Dergisi* 2014; 27(2): 57-61.
92. Saraç G. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenem direnci ve direncin moleküler olarak saptanması. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı. Mersin, 2011.
93. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;60(2):1067-78.
94. Peymani A, Naserpour Farivar T, Mohammadi Ghanbarlou M, Najafipour R. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing bla IMP-1 and bla VIM-1 in Qazvin and Alborz educational hospitals, Iran. *Iran J Microbiol* 2015;7(6):302-9.
95. Fournier D, Richardot C, Müller E et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(8):1772-80.
96. Kosykowska E, Szymanek-Majchrzak K, Walter de Walthoffen S et al. Molecular analysis of carbapenem-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients hospitalized in various transplantation wards between 2008 and 2011. *Transplant Proc* 2014;46(8):2576-8.

97. Meradji S, Barguigua A, Bentakouk MC et al. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns* 2016;42(4):906-18.
98. Shirani K, Ataei B, Roshandel F. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. *Adv Biomed Res* 2016;5:124.
99. Al-Agamy MH, Jeannot K, El-Mahdy TS et al. Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016;2016:4379686.
100. Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase PER-1 and metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61: 221–22.
101. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I ve ark. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* 2007;13(3):191-8.
102. Aktaş Z, Kayacan CB. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008;40(4):320-5.
103. Mansur A, Ay S, Oflu B ve ark. Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Metallo Beta Laktamaz Üretimini Araştırılması. *J Turgut Ozal Med Cent* 2013;20(3):237-242.
104. Yılmaz NO, Agus N, Bozcal E, Uzel A. Prevalence and molecular characterisation of metallo-beta-lactamase producing strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Indian J Med Microbiol* 2014;32(3):349-50.
105. Er H, Altındış M, Aşık G, Demir C. Seftazidime Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Beta-Laktamazların Moleküler Epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(2): 156-165.

106. Hamprecht A, Poirel L, Götting S et al. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(3):558-61.
107. Wendel AF, Brodner AH, Wydra S et al. Genetic characterization and emergence of the metallo- $\beta$ -lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(10):5162-5.
108. Pakbaten Toupanlou S, Najari Peerayeh S, Pirhajati Mahabadi R. Class A and D Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Imipenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(8).
109. Taşbent FE, Özdemir M. *Pseudomonas* Suşlarında OXA Tipi Karbapenemazların Varlığı: Türkiye'den İlk Bildirim. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 26-34.

## 8. SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- AAC: Aminoglikozid asetiltransferazlar  
AAD: Aminoglikozid adeniltransferaz  
aGM1: Asialo-gangliozid-M1  
AME: Aminoglikozid mofiyeden enzimler  
AN: Amikasin  
AprA: Alkalın proteaz  
Ca: Kalsiyum  
CAZ : Seftazidim  
CDC: Centers for Disease Control and Prevention  
CIP: Siprofloksasin  
COL: Kolistin  
ÇDST : Çift Disk Sinerji Testi  
dNTP : Deoksinükleotit trifosfat  
DOR: Doripenem  
DSL: Disülfid bağı  
EARSS: Avrupa Antimikrobiyal Direnç Ağı Sürveyans Sistemi  
E. coli : Escherichia coli  
EDTA : Etilendiaminotetraasetik asit  
EF-2: Elongasyon faktör 2  
ETA : ekzotoksin A  
FEP: Sefepim  
FIM : Floransa İmipenemase  
GES : Guiana Extended Spectrum  
GIM : German İmipenemase  
GN: Gentamisin  
GSBL : Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar  
HE : Hastane Enfeksiyonu  
HKP : Hastane Kökenli Pnömoni  
H<sub>2</sub>S : Hidrojen sülfür  
IL-8: İnterlökin 8  
IMP : İmipenem  
K. pneumoniae : Klebsiella pneumoniae

KDT : Kombine Disk Testi  
KPC : Klebsiella pneumoniae Karbapenemaz  
LEV: Levofloksasin  
MBL : Metallo Beta Laktamaz  
MEM : Meropenem  
MHA : Mueller Hinton Agar  
MHB : Mueller Hinton Buyyon  
MHT : Modifiye Hodge Testi  
MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon  
NDM : New Delhi Metallo Beta Laktamase  
NET: Netilmisin  
OPR : Outer Membrane Protein  
OXA : Oksasilinaz  
QS: Querum sensing  
PBP: Penisilin bağlayıcı proteinlerde  
P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa  
P.luteola: Pseudomonas luteola  
P.oryzyhabitans: Pseudomonas oryzyhabitans  
P.fluorescens : Pseudomonas fluorescens  
P.putida : Pseudomonas putida  
P.stutzeri: Pseudomonas stutzeri  
PIP: Piperasilin  
TZP: Piperasilin tazobaktam  
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
SIM : Seul İmipenemase  
SPM : Sao Paulo Metallo Beta Laktamase  
Taq : Thermus aquaticus  
TMB : Tripoli Metallo Beta Laktamase  
TTSS: Tip III sekresyon sistemi  
VIM : Verona İmipenemase  
YBÜ : Yoğun Bakım Ünitesi  
WHO: World Health Organization

## 9. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Disk diffüzyon görüntüsü .....	50
Şekil 2. Gradyent test görüntüsü (IMP MIK $\geq$ 32 ) .....	55
Şekil 3. Pozitif kombine disk testi görüntüsü .....	58
Şekil 4. Pozitif MBL E-test görüntüsü .....	58
Şekil 5. Pozitif VIM-1 jel görüntüsü .....	60
Şekil 6. Pozitif GIM jel görüntüsü.....	60





## 10. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Klinik önemi olan <i>Pseudomonas</i> 'ların sınıflandırması <sup>11,13</sup> .....	11
Tablo 2. <i>Pseudomonas</i> türlerinin laboratuvar identifikasyon özellikleri <sup>1</sup> .....	12
Tablo 3. <i>P. aeruginosa</i> Virulans Faktörleri <sup>1</sup> .....	13
Tablo 4. Beta-laktamazların sınıflandırılması <sup>41</sup> .....	23
Tablo 5. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri.....	34
Tablo 6. Metallo Beta Laktamaz Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler.....	43
Tablo 7. Reaksiyon bileşenleri .....	44
Tablo 8. İzolatların kliniklere göre dağılımı .....	46
Tablo 9. İzolatların materyallere göre dağılımı .....	46
Tablo 10. İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon ve otomatize sistem (Vitek 2, BioMerieux) antibiyotik duyarlılık testi ile çeşitli antibiyotiklere karşı elde edilen duyarlılık sonuçları.....	47
Tablo 11. İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile saptanan duyarlılık sonuçları .....	48
Tablo 12. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları (Otomatize sistem, Vitek 2 BioMerieux) 50	
Tablo 13. İzolatların E-Test ile belirlenen MİK değerleri .....	54
Tablo 14. Kombine Disk Testi ve MBL E-TEST .....	56
Tablo 15. Metallobetalaktamaz fenotipik test sonuçları .....	59
Tablo 16. MBL fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması .....	59