



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLAN PSEUDOMONAS
AERUGİNOSA SUŞLARINDA KARBAPENEM DİRENCİ VE
DİRENCİN MOLEKÜLER OLARAK SAPTANMASI

Dr. Güliz Saraç
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali Kaya

MERSİN-2011



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLAN PSEUDOMONAS
AERUGINOSA SUŞLARINDA KARBAPENEM DİRENCİ VE
DİRENCİN MOLEKÜLER OLARAK SAPTANMASI

Dr. Güliz Saraç
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali Kaya

Bu tez, BAP-TF DTB (GS) 2010-3 TU protokol no' lu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.

MERSİN - 2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana her konuda yol gsteren, tezimin hazırlanması sırasında deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Baőkanı Sayın Prof. Dr. Ali Kaya'ya; eğitimim süresince bilgilerini aktararak yetiőmemde emeği geçen ve tezimin hazırlanmasında baőtan sona yardımcı olan hocam Sayın Doç. Dr. Gülđen Ersöz'e; ve hocalarım sayın Prof. Dr. Özlem Kandemir ve Yrd. Doç.Dr. Elif őahin'e; rotasyonlarım sırasında eğitimime katkıları dolayısıyla İç Hastalıkları Anabilim Dalı baőkanı Sayın Prof. Dr. Kamuran Konca nezrinde İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma; değerli asistan arkadaşlarım Mustafa, İlker ve Neslihan'a ve diğer asistan arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini esirgemeyen; benimle ağlayıp benimle gülen; her zaman yanımda olan çok değerli annem, babam, ablam Gülay ve kardeőim Ayőegül'e en içten duygularıyla teşekkür ederim

Dr.Güliz SARAÇ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER.....	4
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2. GENEL BİLGİLER	10
2. 1. Hastane Enfeksiyonları.....	10
2. 1. 1. Üriner Sistem Enfeksiyonları.....	13
2. 1. 2. Pnömoniler.....	14
2. 1. 3. Cerrahi Alan Enfeksiyonları.....	14
2. 1. 4. Bakteriyemi	15
2.2. Pseudomonas aeruginosa	16
2.2.1. Mikroskopik Özellikler	17
2.2.2 Kültür Özellikleri.....	17
2.2.3. Biyokimyasal Özellikler	17
2.2.4. Virulans Faktörleri	18
2.2.5. <i>P.aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	20
2.2.6. <i>P.aeruginosa</i> ' da ilaç Direnci.....	21
2.2.7. Beta Laktamaz Enzimleri.....	22
2.2.8. Karbapenemazlar	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 <i>P.aeruginosa</i> İzolatların Tanımlanması	30
3.2.Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	30
3.3 Metallo-beta-laktamazın Fenotipik Olarak Tanımlanması	31
3.3.1 <i>MBL E-test</i>	31
3.3.2 <i>Modifiye Hodge Test</i>	32
3.4 Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Moleküler Analizi	33
3.4.1. <i>P. aeruginosa</i> DNA Örneklerinin Hazırlanması	33
3.4.2. <i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu</i>	33
3.4.3. <i>Agaroz Jel Elektroforez İşlemi</i>	35
4. BULGULAR	37
4.1 İzolatlar	37
4.3.2 <i>MBL E-test</i>	38

4.3.4 “Modifiye Hodge Test” (MHT).....	38
4.4. Metallo-beta-laktamaz Enziminin Genotipik Yöntemle Gösterilmesi	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	51
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	65
TABLolar	66
ŞEKİLLER	67
GRAFİKLER.....	67

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden Hastane Enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Pseudomonaslarda betalaktam antibiyotiklere direnç gelişmesinden sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisi, bakterilerin ürettiği beta-laktamaz enzimleridir. Metallo-beta-laktamaz (MBL) enzim aktivitesi çinkoya bağımlıdır ve EDTA veya merkaptopropionik asit ile inhibe olabilmektedir. MBL tanımlama testlerinde bu enzimlerin EDTA ile inhibe olma özelliğinden yararlanır. Günümüze kadar bildirilmiş olan beş ayrı MBL türü bulunmaktadır. Bunlar IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (Sao Paulo Imipenemase), GIM-1 (German Imipenemase) ve SIM-1 (Seul Imipenemase) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IMP ve VIM tipleri en sık rastlananlardır ve dünya çapında yaygındırlar. En çok bilinen ve en çok araştırılan metallo betalaktamazlar VIM 1 gen ailesidir. Yirmiyedi çeşidi ile 23 ayrı gram negatif basilden, 40'dan fazla ülkede izole edilmiştir. VIM-2, VIM ailesinin dominant tipidir ve Avrupa'nın birçok ülkesinde izole edilmektedir.

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan ve HE tanısı alan hastalardan alınan örneklerden izole edilen 29 *P. aeruginosa* izolatlarında MBL enzimini, fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırması amaçlanmıştır. Metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde iki test uygulanmıştır. E-Test MBL stripleri ve modifiye hodge testi (MHT) ile değerlendirilmiş ve 29 suşun altısı (20,7%) MBL pozitif olarak saptanmıştır. MBL E-Test (IMP-EDTA) ve MHT ile duyarlılık %54, özgüllük %100, Pozitif Prediktif Değer (PPD) %100, ve Negatif Prediktif Değer (NPD) %78 olarak hesaplanmıştır.

Fenotipik test sonuçlarını doğrulamak amacıyla PZR analizi yapılmıştır. PZR ile çalışmaya alınan 29 izolatın 11'inde metallo-beta-laktamaz geni saptanmış, metallo-beta-laktamaz sıklığı %37.9 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. İyi standardize edilmiş, değerlendirme kriterleri belirlenmiş fenotipik testlere ve bu testlerin genotipik olarak doğrulanmasına yönelik çalışmalara gereksinim olduğu görüşüne varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo beta laktamaz, *Bl_{IMP}*, *Bl_{VIM}*, antibiyotik duyarlılık, hastane enfeksiyonları.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa leads hospital infections that have high mortality and morbidity rates. *Pseudomonas aeruginosa* is resistant against beta-lactam antibiotics and one of the most important mechanisms in being resistant to such antibiotics is producing beta-lactamase enzyme. Metallo-beta-lactamase enzyme activity is zinc dependent and is inhibited by EDTA and Mercaptopropionic acid. MBL identification tests are used to its position as the enzymes inhibited by EDTA. Of acquired MBLs, there are five different types have been reported These are the IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-(Sao Paulo Imipenemase), GIM-1 (German Imipenemase) type enzymes.. The IMP- and VIM-type enzymes are the most common and exhibit a worldwide distribution. Of the known MBLs, VIMs are one of the most common families, with 27 variants detected in at least 23 species of Gram-negative bacilli from more than 40 countries/regions. The dominant type of VIM is VIM-2 which has been isolated from strains in most countries within Europe.

In this study, Mersin University school of Medicine Research and Application Hospital inpatient services and a variety of samples isolated from patients with the diagnosis of nosocomial infection were investigated . The aim of this study is to identify metallo-beta-lactamase enzyme in clinical *P.aeruginosa* isolates by phenotypic and genotypic methods. MBL production was found as positive in 6 (20,7%) *P. aeruginosa* strains. In our study, the overall performance of the MBL E test (IPM-EDTA) and MHT revealed Sensitivity, Specificity, Positive ve Negative Predictive Values results of 54%, 100%, 100%, and 78%, respectively.

In order to confirm the results of phenotypic tests, PCR analysis were performed. According to the PCR analysis 11 isolates were found metallo-beta-lactamase positive, and the prevalence of metallo-beta-lactamase was determined as 37.9%.

The results of our study are consistent with other studies in the world and in Turkey. Good standardized phenotypic testing and genotypic testing in this clinical study is needed to confirm the opinion concluded.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-lactamase enzyme, *BlaIMP*, *BlaVIM*, antibiotic susceptibility nosocomial infection.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastane enfeksiyonlarına (HE) bağlı morbidite ve mortalitedeki artış ve tedavinin artan maliyeti, enfeksiyon kontrol stratejilerinin uygulanmasını gerekli kılmıştır. Her merkezin kendi hasta profilini, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları, bunların direnç paternlerini, her bölümdeki HE dağılımını ve sıklığını bilmesi doğru stratejilerin geliştirilmesini sağlar¹. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'inde HE'nin, her yıl 77,000'in üzerinde ölüme ve yıllık 5 -10 milyar dolarlık bir harcamaya sebep olduğu bilinmektedir².

Hastanelerde antibiyotik kullanımının yaygın ve kontrolsüz olması nedeniyle kullanılan antibiyotiklere karşı direnç önemli bir sorun haline gelmiştir³. Hastane enfeksiyonlarının sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve aynı hastanenin farklı birimlerine göre değişmektedir⁴. Günümüzde HE'de Gram-pozitif bakteriler daha sık görülmesine rağmen Gram-negatif bakterilerin önemi devam etmektedir. Gram-negatif bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesiyle bunların neden olduğu HE'nin önemi artmakta ve mevcut antibiyotiklerle bu enfeksiyonların tedavisi zorlaşmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde görülen HE'lerde yüksek dozda, geniş spektrumlu parenteral antibiyotik kullanımı gerektiğinden bu ünitelerde çoklu ilaç direnci (ÇİD) daha önemli hale gelmektedir. Dirençli bir bakteriyle oluşan enfeksiyonla mortalitenin artması, hastanede yatış süresinin uzaması ve maliyetin artması nedeniyle sorun oluşturmaktadır⁵.

Hastane enfeksiyon etkeni olan Gram-negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirmesinde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir⁶. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) birçok enterik bakteride bulunan geniş spektruma sahip beta-laktamaz enzimleridir. Bu enzimleri en çok üreten suşlar *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), ve *Escherichia coli* (*E. coli*)'dir. Bu enzim üretildiğinde organizma, çeşitli beta-laktam antibiyotikleri inaktive etmede oldukça etkili duruma gelmektedir⁶. Rutin olarak uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri başta *Klebsiella spp.* ve *E. coli* olmak üzere Gram-negatif bakterilerde beta-laktam direncini göstermede yetersizdir. Bu testlerle *in vitro* olarak beta-laktam antibiyotiklere duyarlı

oldukları saptanan bazı suşlar *in vivo* olarak dirençli bulunmakta ve bu durum tedavide başarısızlığa yol açmaktadır⁷.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan ve HE tanısı alan hastalardan alınan örneklerden izole edilen *P. Aeruginosa*'nın direnç paterninin araştırılması, disk diffüzyon testi, E-test, MBL E-test ve Modifiye Hodge testlerini PZR ile karşılaştırarak, metallo beta laktamaz direncini saptamada en uygun yöntemi bulmak için planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Hastane Enfeksiyonları

Genellikle hastane enfeksiyonları, hasta hastaneye yattıktan 48–72 saat sonra ve taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişir¹. ABD’de 1987 yılında HE’nin var olup olmadığını belirlemek veya saptanan enfeksiyonu tanımlamak için National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS)’e katılan hastanelerde uygulanmak üzere “Centers for Disease Control” (CDC) tarafından bir dizi tanımlar getirilmiş ve 1988’de uygulanmaya başlamıştır⁸. Bu tanımlamalar daha sonra dünyanın her yerinde kullanılmıştır. Cerrahi alan enfeksiyonlarının tanımı, özellikle derin cerrahi yaraların anatomik tanımlaması için, 1992 yılında değişikliğe uğratılmıştır.

HE tanımlamalarının geçerliliği ve güvenilirliğini tespit için yapılan bir çalışmada NNIS’e katılmayan hastanelerde HE oranı % 79 olarak bulunurken, katılanlarda oran % 86 olarak belirlenmiştir. NNIS’e katılmayan grupta yer alan hastaneler arasında uyum % 79 gibi oldukça iyi bir düzeydedir^{7,9}.

Hastanelerde antibiyotik direnci ile ilgili ilk bildirim 1950’li yıllarda, penisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşuna aittir. Günümüzde HE’lerinin önemli etkenleri koagülaz-negatif stafilokoklar, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve diğer Gram-negatif bakterilerdir¹¹. Kullanılan antibiyotiklerin etki spektrumuna bağlı olarak zaman içerisinde major patojenlerin tümü değişim göstermiş, zaman zaman Gram negatif bakteriler, zaman zaman Gram pozitif bakteriler ön plana çıkmıştır. Gram-negatif bakteriler 1960 ve 1970’li yıllarda en önemli patojenler olarak bildirilmiştir⁴. Günümüzde de Gram-negatif bakteriler, HE’na neden olan etkenlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır¹².

Hastanelerde immün yetmezliği ve malignitesi olan hasta sayısı ve bu hastalara uygulanan invaziv girişimlerin artması ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, özellikle çoklu ilaç direnci olan mikroorganizmaların izolasyonu ve hastane kaynaklı kontamine kan, infüzyon ürünleri, dezenfektanlar gibi sorunlar sebebiyle Gram-negatif bakteriler ile oluşan HE insidansında artışa yol açmıştır¹². Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de ESBL üreten Gram-negatif

bakteriler HE'nin yaygın sebepleri arasındadır¹³. HE'leri için predispozan risk faktörleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Hastane enfeksiyonları için predispozan risk faktörleri¹⁰

Üriner Sistem Enf.	Pnömoni	Dolaşım Sistemi Enf.	Cerrahi Alan Enf.
Cinsiyet (kadın)	İleri yaş	İleri yaş	İleri yaş
İleri yaş	Prematür infant	Prematür infant	Prematür infant
Prematür infant	Kronik Akciğer hastalığı	Obezite	Vasküler kateterizasyon (süre veya sayı)
Böbrek yetmezliği	Abdomino-toraksik cerrahi	Beslenme bozukluğu	Parantral beslenme
Diabetes mellitus	Endotrakeal entübasyon	Diabetes mellitus	Giriş yeri kolonizasyonu
Üretral sonda uygulanmasının süresi ve meatus kolonizasyonu	Mekanik ventilasyon	Kanser	Nonpermeabl pansuman
	Nazogastrik sonda	Cerrahinin süresi	Pansuman (48 saatten az)
	İmmün süpresyon	Cerrahi tekniğin iyi olmaması	
	Antibiyotik kullanımı	Uzamış preoperatif süre	
	Supin pozisyon	Diğer alanlarda enf.	
	Artmış gastrik pH		
	Aspirasyon		

HE'lerinin insidansı coğrafik bölgelere, hastanelere, servislere, ünitelere ve vücut bölgelerine göre değişmektedir. HE'leri epidemik ya da endemik olarak görülebilmektedir. Epidemik HE'leri kısa zaman aralığında çok sayıda topluluğu etkilerken, endemik HE'leri ise sporadik görülmektedir. Stamm ve arkadaşları¹⁵ yaptıkları bir çalışmada Tablo 2'de HE tipi dağılımı gösterilmiştir.

Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda, HE'lerinin görülme sıklığının % 3,1–14,1 arasında değiştiği tesbit edilmiştir. Ülkemizde HE'leri en sık (%42) üriner sistem enfeksiyonları şeklinde görülmektedir.

Tablo 2: Hastane enfeksiyonlarının endemik ve epidemik görölme sıklığı

Enfeksiyon Tipi	Epidemik	Endemik
Üriner Sistem Enfeksiyonları	10	38
Cerrahi Yara Enfeksiyonları	9	27
Pnömoni	12	16
Cilt Enfeksiyonları	11	6
Bakteriyemi	16	4
Menenjit	6	< 1
Hepatit	12	< 1
Gastroenterit	17	< 1

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) hastaları hastanede yatan tüm hastaların % 5–10 gibi küçük bir grubunu oluşturmasına karşın, HE'nin % 25'ini oluşturmaktadır. YBÜ' deki hastaların altta yatan hastalıkları, birden çok hastalıklarının olması, komplikasyonların varlığı, savunma mekanizmalarındaki bozukluklar, uygulanan tedavi ve invaziv girişimler enfeksiyon gelişiminden sorumlu faktörlerdir. YBÜ'lerinde sıklıkla saptanan enfeksiyonlar ise pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, kan dolaşımı ve cerrahi alan enfeksiyonlarıdır⁴.

Hastanemizde Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında Reanimasyon Yoğun Bakım dahil tüm yoğun bakım ünitelerinde yapılan araştırmaya göre, HE hızı %15.3 dansitesi % 27.9 Yeni Doğan Yoğun Bakım'da ise hızı %26.5 dansitesi %16.2 bulunmuş olup, en sık rastlanan patojenlerin ise sırasıyla *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus*, *Candida spp.*, *E. coli* ve *Klebsiella spp.* şeklinde olduğu görülmüştür.*

HE lokalizasyonu gibi etkenlerin dağılımında yıllara, bölgelere, hastanelere ve ünitelere göre farklılıklar görülmektedir.

Stamm ve arkadaşlarına¹⁵ göre endemik ve epidemik HE'lerinde en sık rastlanan patojenlerin dağılımı Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Hastane enfeksiyon etkenlerin endemik ve epidemik görülme sıklığı

Patojen	Epidemik	Endemik
<i>E. coli</i>	3	19
<i>Enterokok spp.</i>	1	10
<i>S. aureus</i>	12	10
<i>Pseudomonas spp.</i>	4	9
<i>Proteus spp.</i>	1	8
<i>Klebsiella spp.</i>	3	8
<i>Enterobacter spp.</i>	7	4

2. 1. 1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

ABD’nde HE’nin yaklaşık % 40’ını oluştururken bu oran ülkemizde % 26-49 arasında değişmektedir. Hastane kaynaklı ÜSE’nin yaklaşık % 80’i sondaya bağlı gelişirken % 10-15’inden sistoskopi ve diğer ürolojik işlemler sorumludur¹⁸. Sondaya bağlı bakteriürilerin büyük çoğunluğu asemptomatiktir¹⁷. *E. coli* hastane kaynaklı bakteriürinin en sık nedenidir ve hastanedeki ÜSE’lerin yaklaşık üçte biri ile yarısından sorumludur¹⁸. Diğer sık rastlanan patojenler *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* ve diğerleridir²⁵.

Sonda kullanımına bağlı bakteriüri görülme oranı kadınlarda % 70–80, erkeklerde % 20-30’dur. Her sonda takılışında bakteriüri oranı % 1-3’dür¹⁸.

CDC’ye göre ÜSE, semptomatik üriner sistem enfeksiyonları, asemptomatik bakteriüri ve üriner sistemin diğer enfeksiyonları olarak üçe ayrılmıştır¹⁸.

Asemptomatik bakteriüri tanısı hastada ateş (38 °C’nin üstünde ateş), pollaküri, dizüri veya suprapubik hassasiyet olmaması ve idrar kültüründe $\geq 10^5$ koloni/mL üreme olması gibi kriterlerin bulunması gerekmektedir. Semptomatik ÜSE tanısının konulması için ise, ateş, pollaküri, dizüri veya suprapubik hassasiyet bulgularından biri ile idrar kültüründe $\geq 10^5$ cfu/mL üreme olması veya ateş, pollaküri, dizüri ve suprapubik hassasiyet bulgularından ikisiyle birlikte piyürinin olması (≥ 10 lökosit/mL), miksiyon yoluyla alınmamış (mesane

kateterizasyonu veya suprapubik aspirasyonu ile alınan gibi) iki idrar kültüründe >100 koloni/mL aynı üropatojenin (Gram-negatif bakteriler veya *Staphylococcus saprophyticus*) üremesi, uygun antibiyotik alan bir hastada üropatojen bir mikroorganizmanın $\leq 10^5$ cfu/mL saf olarak üremesi gibi kriterlerin birisinin olması gerekmektedir¹⁸.

2. 1. 2. Pnömoniler

Hastane kaynaklı pnömoniler (HKP) ventilatör ilişkili pnömoniler ve cerrahi ilişkili pnömoniler olarak iki grupta incelenirler. Hastane kaynaklı pnömoni HE'lerinin ortalama % 15'ini oluşturur¹⁸. HKP tüm ünitelerde görülen HE'ler arasında ikinci sıklıkta görülmesine rağmen YBÜ'nde en sık rastlanan HE'dir. HKP genellikle mekanik ventilasyon kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan mortalite ve morbiditesi en yüksek olan HE hastane kaynaklı pnömonilerdir^{4, 19}. HKP'de mortalite oranı ortalama % 50 olup, % 70'lere kadar çıkabilmektedir. Ventilatöre bağlı pnömonilerde sıklıkla saptanan etkenler; *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* diğer nonfermantatif Gram-negatif bakteriler ve *S. aureus*'tur. NNIS'in 1990–1995 yılları arasındaki verilerine göre Hastane kaynaklı pnömonilerin %67.1'inden Gram-negatif bakteriler sorumludur.

CDC'nin pnömoni tanısı için kriterleri; göğüs muayenesinde raller veya perküsyonda matite bulunması veya akciğer grafisinde yeni ya da progresif infiltrasyon, konsolidasyon, kavitasyon veya plevral effüzyon saptanması ile birlikte hastanın pürülan balgam çıkarmaya başlaması veya balgamın niteliğinde değişiklik olması, kan kültüründe mikroorganizma izole edilmesi, transtrakeal aspirat, bronşial fırçalama veya biyopsi ile elde edilen örnekten patojen izole edilmesi gibi kriterlerinden birinin olması bulunmasıdır.¹

2. 1. 3. Cerrahi Alan Enfeksiyonları

Cerrahi girişimlerden sonra bir enfeksiyöz komplikasyon gelişme riski; cerrahi girişim sırasında olan kontaminasyon ile doğrudan ilişkilidir. Bakteri inokulumunun virulansı, konak direnci ve yaraya ait özellikler daha sonra gelişecek bir yara enfeksiyonunun belirleyicisidir²⁰. Yapılan çalışmalarda cerrahi alan enfeksiyonları opere edilen hastaların % 2,8-17'sinde gelişmektedir³. En sık CAE nedeni *S. aureus*'dur. Gram-negatif bakteriler % 40'ından sorumludur

ve hastanın endojen florasından kaynaklanır²¹. CAE, sıklığı yaranın temiz ya da kontamine olmasına göre değişmektedir; temiz yaralarda % 1,5, temiz-kontamine yaralarda (respiratuvar, gastrointestinal ve genitoüriner sistemlere girilmemiştir, kontaminasyon minimaldir) % 7,7, kontamine (taze travmatik yaralar, nonpürülan inflamasyon bulunan yaralar gibi) yaralarda % 15,2, kirli yaralarda ise % 40 oranında gelişmektedir²⁶. CAE'nun % 40'ı insizyonel CAE'ları ve % 60'ı organ veya boşluk enfeksiyonu şeklinde görülmektedir²². CDC tarafından 2008 yılında yeniden belirlenen CAE; yüzeysel insizyonel cerrahi alan enfeksiyonları, derin insizyonel cerrahi alan enfeksiyonları ve organ/boşluk cerrahi alan enfeksiyonları olarak üç ana grupta incelenmektedirler¹.

Yüzeysel insizyonel CAE tanı kriterleri; ameliyattan sonra 30 gün içinde yüzeysel insizyondan pürülan drenaj gelmesi, yüzeysel insizyondan aseptik olarak elde edilen sıvı veya doku kültüründe organizma izole edilmesi, enfeksiyon belirti ve bulgularından en az birinin olması; derin insizyonel cerrahi bölge enfeksiyonunda ise; organ veya boşluk komponentinden kaynaklanmayan derin insizyondan pürülan drenaj olması, hastada ateş (38 °C'nin üstünde), lokal ağrı veya hassasiyetten en az birinin olması gibi derin insizyonu ilgilendiren abse veya başka bir enfeksiyon bulgusu saptanması olarak açıklanmaktadır¹. Organ veya boşluk CAE ameliyat sırasında açılan veya manipüle edilen ve insizyon dışında kalan organ veya boşlukları ilgilendiren enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. İmplant kullanılmayan hastalarda 30 gün, implant kullanılan hastalarda bir yıl içinde; organ veya boşluğa yerleştirilen drenaj gelmesi, organ veya boşluktan aseptik alınan sıvı veya dokuda mikroorganizma izole edilmesi, organ veya boşlukta abse ya da enfeksiyona ilişkin diğer bulguların olması kriterlerinden birinin olması gerektiği şeklinde açıklanmaktadır¹.

2. 1. 4. Bakteriyemi

HE'leri arasında en ağır klinik tablolardan biri hastane kaynaklı bakteriyemilerdir (HKB). Görülme sıklığı % 2,6–7 arasında olup ölüm oranı % 12–80 arasında bildirilmektedir¹³. Hastane kaynaklı bakteriyemi tanısı kan kültür pozitifliği ile konulur¹³.

Yapılan çalışmalarda bakteriyeminin % 40'ının hastaneden kaynaklandığı ve bunların yarısının kateterle ilişkili olduğu bildirilmiştir²³. Hastane kaynaklı bakteriyemi ve endokarditlerin % 60'dan fazlası damar içi kateter ve araç enfeksiyonlarına bağlıdır; kateter enfeksiyonlarının % 90'dan fazlası santral venöz kateterlere bağlı gelişir²⁰. Stafilokoklar, kateter enfeksiyonlarının en sık rastlanan etkenidir ve tüm Hastane kaynaklı Bakteriyemilerin % 50-75'ine neden olmaktadır²⁴. Yaklaşık % 20'sinde Gram-negatif mikroorganizmalar etken olarak bulunmaktadır¹⁰.

Hastane kaynaklı bakteriyemilerin CDC 'ye göre tanı kriterleri; kan kültüründen patojen olduğu bilinen bir mikroorganizmanın izole edilmesi ve bu patojenin başka bir yerdeki enfeksiyon ile ilişkili olmaması, ateş, titreme veya hipotansiyondan biri ile cilt flora üyesi bir mikro-organizmanın iki farklı kan kültüründe üremesi ve başka bölgedeki enfeksiyonla ilişkili olmaması, kanda patojene ait antijenin saptanması ve başka bölgedeki enfeksiyonla ilişkisinin olmaması gibi kriterlerden birinin olması halinde tanı konulmaktadır¹.

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Daha önceki tarihlerde yaralarda, özellikle de ameliyat yaralarında mavi-yeşil renkli cerahat etkeni olarak göze çarpan *Pseudomonas aeruginosa* 1882'de Gessard tarafından tanımlanmıştır^{27,28}.

Doğada yaygın olarak bulunan; suda, toprakta, bitkilerde, böceklerde, balıklarda, amfibialarda, kuşlarda ve ayrıca insan ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde hastalık yapmaksızın bulunabilen *P.aeruginosa*, Pseudomonadaceae ailesi içindeki *Pseudomonas* cinsinin en önemli nozokomiyal patojeni ve en iyi tanımlanmış türüdür^{27, 28, 29, 30, 31}.

Distile suda bile çoğalabilecek kadar minimal besin maddesine ihtiyaç göstermesi, sıcaklık dahil, farklı fiziksel şartlara uyum göstermesi fırsatçı patojen olarak önemli rol oynamasına yardımcı olur³². *P.aeruginosa* suşları dezenfektan ve sıvı sabunlar, temizlik sıvıları, hasta odalarındaki çiçekler gibi birçok ortamdan izole edilmişlerdir^{28,31}.

2.2.1. Mikroskopik Özellikler

Değişiklik göstermekle birlikte *P.aeruginosa* yaklaşık olarak 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, gram negatif çomaktır. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır. Bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiği vardır ve bu nedenle çok hareketlidir²⁷.

2.2.2 Kültür Özellikleri

P.aeruginosa aerop üreme özelliği gösterir. Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde ürer ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigmenti ayırt edilebilir. Laboratuvarlarda triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukulata agar, Mueller Hinton agar (MHA), endo ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasında önemlidir^{27,28,31,32}.

P.aeruginosa kanlı jelozda beta hemoliz yapar. Kolonileri genellikle 3-5 mm büyüklüğünde, kenarları düzensiz ve üzeri düzgün görünümündedir. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen ve aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) oluşturan suşları ise mukoid tiptedir^{27, 28, 31}.

2.2.3. Biyokimyasal Özellikler

P.aeruginosa oksidaz pozitif olması ve glikozu fermente etmemesi ile Enterobacteriaceae'den ayrılır. Laktoz ve sakkarozu etkisizdir. Katalaz ve l-arginin dihidrolaz oluşturur; lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmaz; indol ve H₂S üretmez. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatiftir; potasyum siyanüre dirençlidir; nitratı nitrite çevirir. Hem organizmada, hem de kültür ortamında hidrosiyanik asit yapma özelliğine sahiptir. *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* aynı bakterilerin diğer kökenlerine etki ederek onları eriten bakteriyosinler yaparlar. Bakteriyosin tiplendirmesi, *P.aeruginosa* kaynaklı HE salgınlarında epidemiyolojik takip için kullanılan yöntemlerden biridir^{27,28,31,32}.

2.2.4. Virulans Faktörleri

P.aeruginosa'nın pigment, hemolizinler, ekzotoksin A, ekzoenzim S, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adezinleri ve aljinat gibi virulans faktörleri vardır. Bunlar bakterinin konağa yerleşmesine ve konağa ait hücreleri hasara uğratmasına yardımcı olurlar³³.

Pigment oluşumu: *P.aeruginosa* kökenlerinin büyük çoğunluğu bir ya da daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, turkuaz mavisi renkli piyosiyenin pigmentidir. Bu özellik *P.aeruginosa*'nın tanısı için önemlidir. Her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamışsa da, diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları saptanmıştır. Ayrıca piyosiyenin pigmenti bakteri hücrelerinin demir alımında da rol oynamaktadırlar^{28,33,34}. Bazı *P.aeruginosa* suşlarının ise sarı renkli piyoverdin, kırmızı renkli piyorubin veya kahverengi piyomelanin pigmenti yaptıkları saptanmıştır. Bu suşlar besiyerlerinde sarı-yeşil, mavi-yeşil, kırmızı, mor ya da kahverengi üremeleriyle özellik kazanırlar. Bakteriler tarafından hücre dışına salınan bu pigmentler, oksijensiz koşullarda görülmezler fakat oda ısısında daha belirginleşirler^{27,28,32}.

Hemolizinler (ramnolipid ve fosfolipaz C): *P.aeruginosa*'nın hemolitik aktivite gösteren bileşiklerinden biri glikolipid yapısında olan ramnolipiddir. Isıya dayanıklı olan ramnolipid, ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten ibarettir. Bu molekül deterjan benzeri bir etki göstermektedir. Fosfolipaz C ile birlikte fosfolipidler üzerinde oluşturduğu çözücü etki ile akciğer yüzey gerilimini inaktive etmektedir. Ayrıca silli trakea hücreleri üzerindeki etkisiyle siliyostaza neden olmaktadır. Ramnolipidin bir diğer etkisi monositlerden oksijen radikalinin jenerasyonunu artırarak *P.aeruginosa* ile enfekte kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde doku hasarına neden olmasıdır^{28,35}. *P.aeruginosa*'nın hemolitik aktivite gösteren bir diğer bileşiği fosfolipaz C'dir. Isıya duyarlı olan fosfolipaz C, lesitinden fosforilkolini ayıran bir lesitinazdır. Fosfolipaz C'nin kistik fibrozlu hastalarda solunum yollarının kolonizasyonunda önemli bir rol oynadığı saptanmıştır. Kan kültüründen izole edilen suşların, diğer kültürlerden izole edilen suşlardan daha fazla fosfolipaz C ürettikleri saptanmıştır^{28,35,36}.

Ekzotoksin A: Ekzotoksin A'nın monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırması bu bakteri ile enfekte hastalarda oluşan kronik akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır. Ekzotoksin A kornea, yanık, yara ve akciğer enfeksiyonlarında önemli bir virulans faktörüdür. Ekzotoksin A difteri toksini ile aynı intrasellüler etki mekanizmasına sahip olmasına rağmen, neden olduğu enfeksiyon tipi farklılık göstermektedir. Bunun nedeni ekzotoksin A'nın, difteri toksininde görüldüğü gibi kana karışarak vücudun diğer bölümlerine yayılmayıp, yerel etki göstermesidir. Bir diğer neden ise bakterinin oluşturduğu ekzotoksin A miktarının suşa bağlı olarak değişmesidir. Kronik akciğer enfeksiyonlarında bakterinin nonmukoid fenotipinin mukoid şekle dönüşmesi sonucu kandaki ekzotoksin A'nın miktarı geriye dönüşümlü olarak belirgin bir şekilde azalmaktadır^{28,37,38,39,40}.

Ekzoenzim S: Ekzoenzim S ökaryotik hücrelerde bulunan bir veya birden fazla proteini modifiye etmektedir. Sadece ekzotoksin A veya ekzoenzim S oluşturan suşlara göre, her ikisini de oluşturan suşlarla enfekte olan hastalarda mortalite oranı daha yüksektir. Ekzoenzim S oluşturan suşlarla daha yüksek mortalitenin görülmesi, bu enzimin *P.aeruginosa*'nın etken olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarında gözlenen progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını göstermektedir^{28,41,42}.

Proteazlar (alkali proteaz ve elastaz): Alkali proteaz ve elastaz *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan en önemli virulans faktörleri arasındadır. Jelatini, kazeini, laminini ve immüoglobulinleri parçalarlar. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır. Proteazlar *P.aeruginosa* ile kronik olarak enfekte kistik fibrozlu hastaların tükürüğünde saptanan konsantrasyonlarda, insan periferik kan nötrofillerinin kemotaksisini inhibe ederler. Bu da *P.aeruginosa*'nın konağın ilk savunma hattından kaçışında önemlidir. Bu kaçış mekanizması bakterinin üremesine, çoğalmasına ve sonuçta kolonizasyon oluşturmaya neden olmaktadır^{38,43,44,45}.

Yüzey adezinleri: *P.aeruginosa*'nın yüzeyinde iki adezin bulunmaktadır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir. Piliye bağlı tutunma, immün sistemi baskılanmış hastaların üst solunum yollarının ve hasar görmüş alt solunum yolu epitellerinin kolonizasyonunda önem kazanmaktadır. Enfeksiyon süreci ilk olarak bakterinin

pilileri aracılığıyla yanak epitelı yüzeyindeki belirli reseptörleri tanıması ve yapışmasıyla başlamaktadır.

P.aeruginosa kistik fibrozlu hastaların yanak epiteline normal kişilerinkinden daha iyi tutunabilmektedir. Hastaların tükürüğünde bulunan proteazlar hücre yüzeyinden fibronektini ayırmakta ve bu şekilde yanak epitel hücreleri ve trakeal epitel hücre yüzeyindeki reseptörler açığa çıkmaktadır. *P.aeruginosa*'nın mukoid suşları hasar görmemiş normal trakeal epitel hücrelerine nonmukoid suşlardan daha fazla miktarda tutunabilmektedir. Piliye bağlı tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önem kazanırken, aljinata bağlı tutunma, mukosilyer atılımın hasar gördüğü durumlarda, alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk basamağı oluşturmaktadır. Ancak burada epitel hücrelerinde belirgin bir hasar gerekmemektedir^{28,46,47}.

Aljinat (Mukoid Ekzopolisakkarit): *P.aeruginosa*'nın aljinatı anyonik bir polisakkarittir ve antifagositik etki oluşturan bir yapıya sahiptir. Bu etki nötrofillerin kemotaksisini inhibe etmesi, komplemanı alternatif yoldan aktive etmesi ve bakteriye karşı zayıf opsoninlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır⁴⁸.

2.2.5. *P.aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

Çok sık görülen direnç sorunları nedeniyle *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı duyarlılık deneyi sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon, ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktam; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır^{27, 28, 31}.

Beta laktamlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktam, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş temel alt gruba ayrılırlar. Beta laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde

kullanılan antibakteriyellerin başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir⁴⁹.

2.2.6. *P.aeruginosa'* da ilaç Direnci

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Enterobacteriaceae* ailesi, *Acinetobacter* türleri ve *P. aeruginosa'* da saptanan kinolon direnci ve geniş spektrumlu beta-laktam ajanlara karşı gelişen direnç nedeniyle bu mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmaktadır. Latin Amerika ülkelerini kapsayan çok merkezli bir çalışmada, 5 yıllık süre içinde karbapenemlerin de içinde bulunduğu antipseudomonal ajanlara karşı direncin yıllara göre artış gösterdiği ve direnç oranının %40' a ulaştığı belirlenmiştir⁵⁰.

P.aeruginosa' da pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik direnç bulunmaktadır. Bu intrinsik çoklu ilaç direncinin nedenleri arasında ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ve kromozomal indüklenebilir ya da dereprese AmpC beta-laktamaz enzimlerinin varlığı sayılabilir. *P. aeruginosa'* da beta-laktam ajanlara, özellikle karbapenemlere karşı dirençte rol alan en önemli kazanılmış direnç mekanizması ise metallo-beta-laktamazlardır (MBL)⁵¹.

2.2.6.1. Biyofilm direnci

Biyofilm içindeki mikroorganizmalar bir ölçüde saklı kaldıkları için fagositik hücreler tarafından tanınamamakta ve böylece fagositozdan korunmaktadırlar. Biyofilm aynı zamanda antimikrobiyal ilaçlar için polianyonik bir bariyer oluşturarak ilaç direncine yol açmakta, özellikle beta laktam antibiyotiklerin hücre içine penetrasyonunu önleyerek tedaviyi güçleştirmektedir. Ayrıca biyofilmin alt katmanlarına doğru pH değeri yedinin altına inmekte ve böylece antibiyotiklerin işlevleri bozulmaktadır. En alt katmanlarda ise oksijen geçişi olmadığı için anaerop koşullar oluşmakta ve bu nedenle antipseudomonal ajanlar tek başlarına etki edememektedirler⁵².

2.2.6.2. Pompa (efluks) direnci

Pompa direnci eskiden beri bilinen fakat bakterilerdeki yaygınlığı ve etkinliği daha yeni anlaşılmaya başlayan bir mekanizmadır. Bakterilerdeki pompa sistemleri transport proteinlerinden oluşur. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici bir gen kontrolünde çalışır. Antibiyotik dışarı pompalanınca bakteride hücre içi antibiyotik düzeyi düşer, ribozom antibiyotik etkisinden korunur ve protein yapımı yani bakteri üremesi devam eder. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşma sonucu pompa sistemi indüklenirse, düzenleyici gende mutasyon ile pompa proteinlerinin aşırı üretimi başlayabilir. Sonuç bir ya da birden çok substrata direnç şeklindedir. Gelişen direnç düşük düzeylidir fakat bir mutasyon başka mutasyonları tetikleyebildiği için, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından bakteride antibiyotiğin bağlandığı hedefin değişmesi, antibiyotiğe geçirgenliğinin azalmasına yol açacak şekilde porin üretiminin bozulması veya antibiyotiği parçalayan bir enzimin sentezlenmesi gibi diğer bir mutasyon gelişir ve direnç düzeyi katlanarak artar^{53,54}.

2.2.6.3. Dış Membran Geçirgenliği

P.aeruginosa' da görülen çoklu ilaç direncinin diğer bir nedeni dış membran geçirgenliğinin azalmasıdır. Karbapenem direncinde, dış membranda bulunan OprD proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyon ile OprD proteinin eksprese olmaması, bu ajanların bakteri hücrelerine girişini kısıtlamaktadır⁵⁵. OprD proteininin yokluğu, karbapenem grubu antibiyotikler içinde özellikle imipenem direncinin gelişmesinde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, OprD proteini olmayan izolatlarda, imipenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin meropeneme göre dört kat arttığı belirlenmiştir. Karbapenemlere karşı dirençte OprD kaybı önemli olmakla birlikte tek başına dirençte rol almadığı belirlenmiştir. Karbapenemlere direncinde beta-laktamaz enzimlerinin de son derece önemli bir rolü bulunmaktadır⁵⁶.

2.2.7. Beta Laktamaz Enzimleri

Beta laktamaz enzimleri ile inaktivasyon beta laktam antibiyotiklere karşı dirençte en sık gözlenen mekanizmadır^{57,58}. Beta laktamaz etkisiyle beta laktam

halkası hidrolize uğrayarak açılır ve sonuçta antibiyotik etkisiz hale gelir. Her gram negatif bakteri türe özgül olmak üzere genellikle az miktarda kromozomal beta laktamaz sentezlemektedir⁵⁹.

İlk beta laktamaz enzimi penisilinin ticari olarak kullanıma girmesinden çok daha önce bir *Escherichiae coli* suşunda tanımlanmıştır⁶⁰. İlk plazmid kökenli beta laktamaz TEM-1 adıyla 1965'te bir *E.coli* izolatında bildirilmiştir⁶¹.

Penisilinin tedavide kullanılmaya başlamasından sonra ilk olarak *Staphylococcus aureus*'ta ve daha sonraları da farklı bakterilerde plazmid kökenli penisilinaza bağlı penisilin direnci saptanmıştır^{57,60,62}.

Abraham ve Chain'in 1940 yılında bildirdikleri penisilinaz ile birlikte beta laktamazların ilk sınıflandırılması yapılmıştır. Bundan sonra yapılan ve kabul gören ilk sınıflandırma, Sawai ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırma olmuştur. Sawai 1968 yılında enzimleri penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayırmıştır. Richmond ve Sykes ise 1973 yılında yaptıkları sınıflandırmada o güne kadar bilinen tüm gram negatif bakteri beta laktamazlarını substrat profillerine göre beş grupta toplamışlardır⁵⁷. Daha sonra Matthew⁶³ özgül beta laktamazların izoelektrik nokta tayini (Isoelectric Focusing, IEF) yöntemi ile tanımlayabileceğini gösterdikten sonra 1976'da bu şema Sykes ve Matthew tarafından tekrar düzenlenmiştir. 1981'de Mitsuhashi ve Inoue'nin yaptığı sınıflamaya sefuroksimi hidrolize eden beta laktamazlar kategorisi de eklenmiştir. Moleküler yapı ile ilgili sınıflandırma ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Sınıf C sefalosporinazlar 1981 yılında Jaurin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidrolize eden D sınıfı enzimler ise 1980'lerin sonunda diğer serin-enzimlerden ayrılmıştır. 1989'da Bush⁶⁴ tarafından önerilen gruplamada tüm bakterilerin beta laktamazları yer almış ve ilk kez substrat ve inhibitör özellikleri moleküler yapı ile ilişkilendirilmiştir ve moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır.

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, öncelikle penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır. gram negatif bakterilerde en sık bulunan TEM-1 enzimi bu gruba iyi bir örnektir.

Sınıf B: Aktive gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metalloenzimlerdir.

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

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios tarafından biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre betalaktamazların 4 gruba ayrıldığı sınıflandırmadır. Bu grupların genel özellikleri tablo 2'de görülmektedir. Grup 1'de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar, Grup 2'de beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan moleküler sınıf A ve D içinde yer alan enzimler, Grup 3'te EDTA dışındaki beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmayan metallo-beta-laktamazlar, Grup 4'te ise klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır⁶⁵.

Grup 1: Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapenem karşı da duyarlıdırlar. Grup 1 enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve Enterobacteriaceae arasında yoluyla aktarılabilmektedir.

Grup 2: En geniş kategoriyi oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküller sınıf olarak A ve D'de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamı hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar⁶⁷. 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar^{58,66,68}.

Grup 3: Moleküler sınıf B'de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. Monobaktam dışında karbapenemler dahil tüm betalaktamları hidroliz edebilirler. Klavulanik asit veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmaz, EDTA ile inhibe olurlar. Aktiviteleri için Zn (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu beta-laktamazlar a,b,c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar.

Grup 4: Klavulanik asit ile pek de iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan oluşur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *A.faecalis*, *B.fragilis*, *C.jejuni*'den izole edilen enzimler, *C.butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı bu gruba sokulmuştur. *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar da bu gruba dahildir.

Tüm bu 4 grup beta-laktamaz, fonksiyonlarındaki çeşitliliği sergiler. Tek bir bakteride birden çok beta-laktamaz tipi aynı anda görülebilir ve bu çok sık olan bir durumdur. Böylece kromozomal ve plazmid kökenli beta-laktamazlar bazen iç içe geçerler. Hastane Enfeksiyonlarında en sık sorun olarak karşılaşılan enzimler, Grup 1'deki kromozomal beta-laktamazlar, Grup 2'deki ESBL ve Grup 3'deki beta-laktamazlardır.

Tablo 4: Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri

Beta-laktamaz grubu	Alt grup	Molekül sınıfı	İnhibisyon EDTA	Özellik
1		C	-	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir). Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2		A, D	-	Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur.
	2a	A	-	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar.
	2b	A	-	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1).

	2be	A	-	Oksiiminosefalosporin ve monobaktama direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (ESBL).
	2br	A	-	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) betalaktamazlar.
	2c	A	-	Karbenisilini hidroliz eden enzimler.
	2d	D	-	Oksasilini hidroliz eden enzimler. Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	-	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar.
	2f	A	-	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler.
3	3abc	B	+	Metallo-beta-laktamazlar. Klavulanik asit ile inhibe olmazlar.
4		?		Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş.

2.2.8. Karbapenemazlar

Karbapenem grubu ajanlara etkili beta-laktamazlar genetik ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı, çoğu yalnız karbapenemlere değil diğer beta-laktam ajanlara da etkili enzimlerdir. Karbapenemlere etkili enzimler, moleküler yapı açısından sınıf A serin beta-laktamazlar veya sınıf B metalloenzimler arasından yer almaktadır. Ayrıca sınıf C sefalosporinazların da karbapenem grubundaki ajanlara kısmen etkili olabildiği ve bu enzimlerin aşırı üretildiği mutantlarda yüksek düzeyde imipenem direncine yol açabildiği bildirilmektedir⁶⁹.

Karbapenemazlara *Bacteroides spp. türleri*, *Xanthomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium odoratum* ve *Bacillus cereus* gibi bazı bakterilerde oldukça sık rastlanmaktadır. Enterobakter'lerde de karbapenemlere karşı enzimatik direnç *Serratia marcescens*'in dört suşunda ve *Enterobacter cloacae*'nin iki suşunda bildirilmiştir⁷⁰. Sme-1, Nmc-A, IMI-1 klavulanat ile inhibe olan penisilinazlar iken, IMP-1 B sınıfı bir metalloenzimdir. Plazmid kaynaklı IMP-1 hariç bu karbapenemazlar kromozomdadır (Grup A). Nmc-A geni, 1990 yılında Paris'te *E. cloaca*'dan izole edilmiştir⁷⁰. Bu gen herhangi bir üçüncü kuşak sefalosporini belirgin olarak hidrolize etmez. Sme-1, Nmc-A veya IMI-1 benzer hidrolitik profile sahiptir. Bunların tümü imipeneme meropenemden

daha dirençlidir. Ayrıca son yıllarda *Acinetobacter baumannii*'de saptanan iki enzim daha vardır; ARI-1 ve ARI-2, imipenem ve azlosilini hidrolize etmekte, ancak sefalosporinlere orta derecede direnç oluşturmaktadırlar. ARI-1 genlerinin bir plazmidde bulunduğu tesbit edilmiştir⁷⁰.

IMP-1 karbapenemleri, A sınıfı karbapenemazların yaptığı seviyeden çok daha yüksek seviyede hidroliz yapar. Aynı zamanda üçüncü kuşak sefalosporinleri de hidrolize eder. IMP-1 aktivitesi klavulanat tarafından inhibe edilmez, ama EDTA tarafından inhibe edilir. Bu enzim karbapenemler dahil çoğu beta-laktama etkilidir, ancak aztreonama duyarlıdır. IMP-1, A sınıfı karbapenemazlardan daha büyük bir tehdittir. Çünkü plazmid lokalizasyonlu olup direnç taşıyıcısı olduğu bilinen *Klebsiella spp.* türlerinde bulunmuştur⁶⁹.

Metallo Beta Laktamazlar (MBL): MBL'ler Ambler sınıflamasına göre Sınıf B'de, Bush sınıflamasına göre Grup 3'te yer alırlar. MBL aktivitesi çinkoya bağımlıdır ve EDTA veya merkaptopropionik asit ile inhibe olabilmektedir. MBL tanımlama testlerinde bu enzimlerin EDTA ile inhibe olma özelliğinden yararlanılır^{71,72}. Metallo enzimler imipenemi ve meropenemi iyi hidrolize ederler ancak aztreonama etkisizdirler. Bu enzimler aktif bölgelerindeki çinko iyonu aracılığıyla karbapenemleri hidrolize ettikleri için karbapenemazlar olarak adlandırılırlar⁷³. MBL'lerin metal iyonları beta laktam halkasının siklik amid bağını kıran nükleofillere yardımcı nitelikteki su moleküllerini koordine ve biyolojik olarak antibiyotiği inaktive ederler. MBL'ler geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikleri yüksek oranda hidrolizlerler. MBL üreten gram negatif bakteriler genellikle oksiminosefalosporinler, sefamisinler ve karbapenemlerin de dahil olduğu birçok geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiğe direnç göstermektedirler⁷². MBL'ler *Bacillus cereus*, *B.fragilis*, *S.malthophilia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Janthinobacterium lividum*, *Aeromonas spp.* ve *Caulobacter crescentus*'un dahil olduğu saprofit veya patojen birçok bakteriden tanımlanmışlardır^{73,74}. Bu bakterilerden *S.malthophilia* ve *B.fragilis* dışındakiler klinik örneklerden seyrek olarak izole edilirler⁷³. Nosokomiyal patojenlerin en önemlileri MBL üreten gram negatif bakterilerdir. Bu suşların yaygınlaşmasının gelecekte bir seri global probleme neden olabileceği düşünülmektedir⁷². Günümüze kadar bildirilmiş olan beş ayrı MBL türü bulunmaktadır. Bunlar IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1

(Sau Paulo Imipenemase), GIM-1 (German Imipenemase) ve SIM-1 (Seul Imipenemase) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IMP ve VIM tipleri en sık rastlananlardır ve dünya çapında yaygındırlar. SPM-1 Güney Amerika'da yaygındır ve henüz başka bölgelerden bildirilmemiştir. GIM-1 ve SIM-1 ise yalnız birer suşta tanımlanmıştır⁷⁵.

IMP: İlk kez 1991 yılında Japonya'da izole edilen bir *S.marcescens* suşunda bulunmuştur⁷³. IMP-1 kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilen bir MBL'dir. Penisilinlere, sefalosporinlere, sefamisinlere, oksasefamisinlere ve karbapenemlere direnç sağlamakta fakat monobaktama etki etmemektedir^{71, 76}. IMP tipi enzimler Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa* ve diğer gram negatif nonfermentatif bakterilerden izole edilen ilk MBL'lerdir. IMP-1'in Uzak Doğu'nun diğer ülkelerinde, Avrupa'da, Kanada'da, ABD'de, Güney Amerika'da ve Kuzey Afrika'da da görülmesi bu enzimin geniş bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir^{72, 77, 78}. IMP-1'in bir varyantı olan IMP-2 İtalya'da bir *A.baumannii* suşundan izole edilmiş ve bu ilk Avrupa örneği olmuştur⁷⁸. 2002 yılında Brezilya'da bronkojenik karsinomu olan bir hastadan izole edilen *P.aeruginosa* suşunda bulunan IMP-16 en son bulunan IMP tipi enzimdir⁷⁹.

VIM: İlk VIM enzimi olan VIM-1 İtalya'da 1997'de bir *P.aeruginosa* suşunda bulunmuş ve kromozomal kaynaklı olduğu saptanmıştır^{71,72}. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan penisilinleri, sefalosporinleri, sefamisinleri, oksasefamisinleri ve karbapenemleri hidrolize eder fakat monobaktama etkisizdir. VIM-1, IMP-2 ile %28 aminoasit benzerliğine sahiptir⁷¹. VIM tipi enzimler Avrupa ve Güney Asya'da *P.aeruginosa* izolatlarında bulunmuşlardır ancak VIM-7 varyantı ABD'den de bildirilmiştir^{80, 81}. VIM-tipi MBL'ler ilk olarak *P.aeruginosa*'da tanımlanmış, daha sonra diğer nonfermentatif gram negatif çomaklarda ve Enterobacteriaceae üyelerinde de saptanmıştır. Bu güne kadar 12 VIM varyantı saptanmış ve bunlar VIM-1, VIM-2 ve VIM-7 olmak üzere üç alt grupta toplanmışlardır. VIM-1 grubu; VIM-4, VIM-5 ve VIM-11A'yı; VIM-2 grubu VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10 ve VIM-11B'yi kapsamaktadır. VIM-7 ise diğer VIM tiplerinden belirgin bir şekilde farklı olduğu için tek başına bir grup oluşturmaktadır. 2005 yılında Yunanistan'da cerrahi operasyon geçirmiş bir hastanın kan kültüründe üreyen bir *K.pneumoniae* suşundan izole edilen VIM-12 en son bulunan VIM-tipi enzimdir. VIM-12, VIM-1 ile %97, VIM-2 ile %93.6 aminoasit benzerliğine sahiptir⁸².

SPM: SPM-1 ilk olarak 1997'de Sao Paulo-Brezilya'da bir *P.aeruginosa* izolatından identifiye edilmiştir^{72,83}. SPM-1 daha sonra Brezilya'da yaygınlaşmış ancak dünyanın diğer bölgelerinde bu enzime rastlanmamıştır⁸⁴. IMP ve VIM'den farklılık gösteren yeni bir MBL'dir⁷⁸. SPM-1, IMP-1 ile yalnız %35.5 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. SPM-1 de, IMP ve VIM varyantları gibi beta laktamları hidrolize etmekte ancak aztreonama etki etmemektedir. SPM-1 bilinen tek SPM türevi enzimdir⁸⁵.

GIM: GIM-1 ilk kez Almanya'da, SENTRY çalışması kapsamına giren karbapenem dirençli bir *P.aeruginosa* izolatında bulunmuştur. Yeni bir MBL türü olan GIM-1 daha önce tanımlanan diğer dört MBL türünden farklı olmakla birlikte, IMP-1 varyantları ile %40 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. GIM-1, MBL ailesinin diğer üyelerine benzer özellikler taşır. Bununla birlikte, diğer MBL türü enzimler imipeneme meropenemden daha fazla etki ederlerken GIM-1'in imipeneme ve meropeneme etkisi eşit orandadır. GIM-1 dışında başka GIM türevi enzim bulunmamaktadır⁸⁶.

SIM: SIM-1 yeni bir MBL alt sınıfıdır. İlk kez Seul'de pnömonili bir hastanın balgam kültüründen izole edilmiş olan *A.baumannii* suşunda tanımlanmıştır. Diğer MBL'lerden farklı olmasıyla birlikte IMP-1 ailesinden IMP-12 ile %69 ve IMP-9 ile de %64 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. SIM-1 bilinen tek SIM türevi enzimdir⁷⁵.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Haziran 2008 – Haziran 2010 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde çeşitli kliniklerden izole edilen CDC kriterlerine göre nozokomiyal enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen ve karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli olduğu kabul edilen 29 adet *P.aeruginosa* suşu incelendi.

3.1 *P.aeruginosa* İzolatların Tanımlanması

Suşlar klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmış ve çalışmaya alındı. Mavi-yeşil pigment oluşturan, nonfermantatif oksidaz pozitif ve 42°C'de de üreyebilen suşlar *P.aeruginosa* olarak tanımlanmış ve çalışmaya alındı. Çalışma gününe kadar izolatlar %10 gliserol içeren buyyon besiyerinde -70°C'de saklandı.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon ve E-test yöntemleri kullanılmıştır. Deneylerde 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerleri (BBL, ABD) kullanıldı. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile imipenem (IPM) (10 µg) veya meropenem (MEM) (10 µg) diskleri (Oxoid) etrafındaki inhibisyon zon çapları <16 mm olan gram negatif suşlar (≤13 mm. dirençli, 14-15 mm. orta derecede duyarlı) çalışmaya alındı. Bu suşlardaki direnç, E test yöntemi (AB Biodisk, Sweden) ile imipenem ve meropenem için MİK tespit edilerek (MİK değeri ≤ 4 µg/mL duyarlı, 8 µg/mL orta derecede duyarlı, >8 µg/mL dirençli) doğrulandı. 29 suştan 20 (%69) si karbapenem dirençli bulundu.

Disk Difüzyon Yöntemi: İzole edilen suşların imipenem duyarlılıkları EUCAST önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı⁸⁷. Bu yöntemde, incelenecek suşların 18-24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerinden doğrudan Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) (BBL, ABD) içinde süspansiyonları hazırlanarak, inokulum yoğunluğu McFarland 0.5 standardına

göre ayarlandı. ($1,5 \times 10^8$ cfu/mL). İnokulum hazırlandıktan sonra steril bir eküvyon yardımıyla yüzeyi kurutulmuş MHA besiyerinin tüm yüzeyine inoküle edildi. Ekim yapılmış besiyeri üzerine antimikrobik ilaç diski yerleştirildi. Besiyerleri 18-24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek yine EUCAST sınır değerlerine göre değerlendirildi. (Tablo 5) Kalite kontrol amacıyla standart suş olarak, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* 27853 kullanıldı⁸⁷.

Tablo 5: İmipenem ve Meropenemin Enterobacteriaceae ve nonfermentatif gram negatif bakteriler için EUCAST referans değerlerine göre MİK değerleri

MİK ($\mu\text{g/ml}$)	Sonuç
≤ 4	Duyarlı
8	Orta duyarlı
>8	Dirençli

3.3 Metallo-beta-laktamazın Fenotipik Olarak Tanımlanması

Bugüne kadar rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında metallo-beta-laktamaz tespiti için kullanılmak üzere geliştirilen testlerin bir çoğu bu enzimlerin EDTA ya da 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliğinden faydalanarak geliştirilmiştir.

3.3.1 MBL E-test

Çalışmamızda kullandığımız E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) ticari olarak bulunan ve metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir testtir. E-test şeritinin bir tarafında giderek azalan konsantrasyonda imipenem ($256 \mu\text{g/mL}$ - $4 \mu\text{g/mL}$), diğer tarafında ise imipenemle birlikte EDTA bulunmaktadır ($64 \mu\text{g/mL}$ - $1 \mu\text{g/mL}$). İmipenem+ EDTA kısmında imipenem konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu ($4 \mu\text{g/mL}$) sabittir. İmipenem+EDTA MİK değeri imipenem MİK değerine göre en az sekiz kat azalır, test metallo-beta-laktamaz enzimi açısından pozitif kabul edilmektedir. Testin pozitif olmasının diğer bir kriteri, E-test şeritinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde “ghost zone” (hayalet bölge) olarak

adlandırılan görüntünün izlenmesidir⁸⁸. Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarına uygulanan E-test yönteminde, bakteri izolatlarının taze kültürlerinden MHB'na 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril bir eküvyonla MHA üzerine bakterinin homojen inokülasyonu yapıldı. Besiyeri yüzeyinin kurummasının ardından E-test seridi besiyeri üzerine yerleştirildi ve plaklar 35 °C'da 18 saat inkübe edildi. Testin kalite kontrolü, diğer testlerde kullanılan metallo-beta laktamaz pozitif ve metallo-beta laktamaz negatif suşlar ile yapıldı.

3.3.2 Modifiye Hodge Test

“Modifiye Hodge Test” (MHT), diğer testlerin aksine metallo-beta-laktamaz enziminin EDTA varlığında inhibe olması prensibine dayanmamaktadır. MHT, imipeneme duyarlı bir bakteri izolatının, metallo-beta-laktamaz üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu imipenem varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır⁸⁹. Bu testte imipeneme duyarlı bakteri suşu olarak *E.coli* ATCC 35218 kullanıldı. MHT uygulanmadan önce kullanılacak olan *E.coli* suşunun imipeneme duyarlı olduğu disk difüzyon yöntemiyle doğrulandı. *E.coli* suşunun kanlı agardaki taze kültüründen MHB'na 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu yapılarak, bakteri süspansiyonunun MHB' da 1:10 sulandırımı yapıldı ve steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben besiyerinin merkezine meropenem diski (10µg) yerleştirildi. Test edilecek *P.aeruginosa* izolatının kanlı agardaki taze kültüründen steril eküvyon yardımıyla bakteri kolonileri toplandı ve meropenem diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru yoğun bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif kontrol olmak üzere toplam iki izolat çalışılmış oldu. İnokülasyonu takiben plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi.

E.coli suşuna bağlı oluşan inhibisyon zonunun *P.aeruginosa* üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E.coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.

3.4 Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Moleküler Analizi

Disk difüzyon yöntemiyle imipenem dirençli olarak kabul edilen *P.aeruginosa* suşlarının PZR yöntemiyle IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 direnç genleri içerip içermedikleri araştırılmıştır.

3.4.1. *P. aeruginosa* DNA Örneklerinin Hazırlanması

Hızlı DNA ekstraksiyon protokolü⁹⁰ besiyerinde üreyen *P. aeruginosa* kolonilerine uygulandı. Bu yöntemde, 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne 1 ml steril distile su konuldu. Bir öze dolusu koloni su içerisinde süspanse edildi ve 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpü 12.000xgravity (g)'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildi. Karışım 12.000xg'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere yeni bir steril ependorfa aktarılarak PZR'de kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

P. aeruginosa'nın metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgeleri primer spesifik PZR tekniği ile çoğaltıldı. Bu genlerin araştırılacağı hedef bölgeler ve bu bölgeler ile ilgili primer dizileri Shibata ve arkadaşlarının⁷² çalışmalarından seçildi. Bu gen bölgeleri ile ilgili primer çiftleri Tablo 6 da verilmiştir

Tablo 6: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerine spesifik primer dizileri⁹¹.

Gen Bölgesi	Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')
IMP-1	F1	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC
	R1	ACAACCAGTTTTGCCTTACC
IMP-2	F2	GTTTTATGTGTATGCTTCC
	R2	AGCCTGTTCCCATGTAC
VIM-1	F3	AGTGGTGAGTATCCGACAG

	R3	ATGAAAGTGCGTGGAGAC
VIM-2	F4	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG
	R4	CTACTCAACGACTGAGCG

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Her bir gen bölgesi için standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler (F1-R1, F2-R2, F3-R3 ve F4-R4), Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen *P. aeruginosa* DNA'sı konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Tablo 7. de belirtilmiştir.

Tablo 7: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerinin PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	IMP-1 gen bölgesi (587 baz çifti)	IMP-2 gen bölgesi (678 baz çifti)	VIM-1 gen bölgesi (261 baz çifti)	VIM-2 gen bölgesi (801 baz çifti)
Distile su	36,7 µl	32,75 µl	32,75 µl	32,75 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10X PZR tamponu	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer (100 pmol/µl)	0,25 µl (F1)	0,5 µl (F2)	0,5 µl (F3)	0,5 µl (F4)
Primer (100 pmol/µl)	0,25 µl (R1)	0,5 µl (R2)	0,5 µl (R3)	0,5 µl (R4)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,3 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl
Ekstrakte edilen DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Hazırlanan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine 45 µl olacak

şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IMP-1, IMP-2, VIM1 ve VIM-2 gen bölgeleri için ısı döngü cihazında PZR koşulları Tablo 8'deki gibi uygulanmıştır.

Tablo 8: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	1 dakika	30
Primer Bağlanması (Annealing)	55	1 dakika	
Zincir Uzaması (Extension)	72	1,5 dakika	
Son Uzama	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye muhafaza edilmiştir.

3.4.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR ile metallo β laktamaz üretiminden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra %1,5'luk agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10 kat konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1kat olacak şekilde distile su ile sulandırıldı.

• Agaroz Jelin Hazırlanması

Bir balon jodede 0,45 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra etidyum bromidden 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların

yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşana kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 10'ar µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

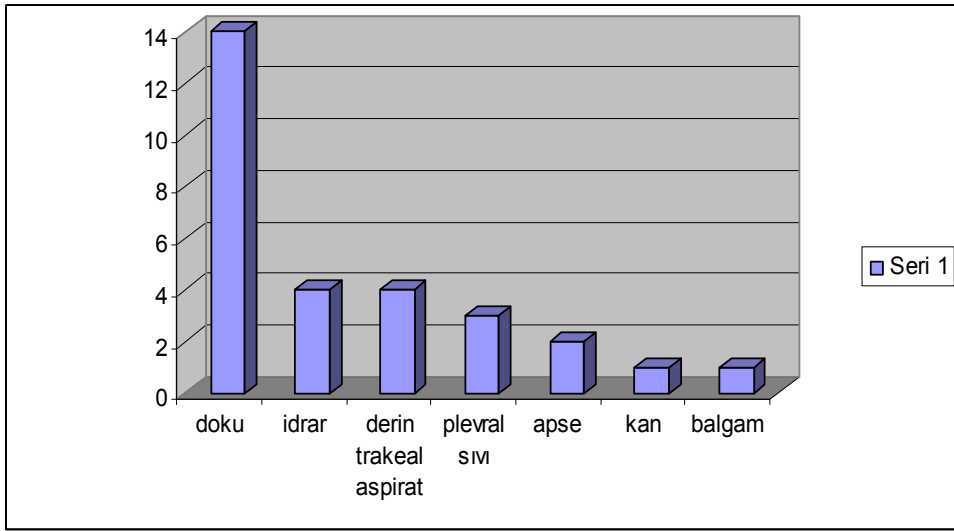
3.5 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analizlerde kategorik veriler arasındaki ilişkiler ki-kare veya Likelihood Ratio test istatistiği ile incelendi. E-Test , MHT ve MBL E-Test (IMP-EDTA) testlerinin PZR pozitifliğe göre Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri hesaplandı. PZR-negatif ile PZR-pozitif grupları arasında yaş, süre ve tedavi süresi bakımından bir farklılık olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistik analizler SPSS v.11.5.1 ve MedCalc .11.5.1 paket programları ile yapıldı. İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 İzolatlar

Çalışmaya alınan 29 *P.aeruginosa* izolatı doku (14 %48.3) , idrar (4, %13,8), derin trakeal aspirat (4, %13,8), plevral sıvı (3 %10.3), balgam (1, %3,4), kan (1, %3,4), apse (2, %9,8), olmak üzere pek çok klinik örnekten ayrıştırılmıştır.(Grafik 1) İzolatların ayrıştırıldığı örneklerin gönderilen bölümlere göre dağılımı Tablo 9 da verilmektedir.



Grafik 1: İzole edilen *P.aeruginosa* suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

Tablo 9: Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarının ayrıştırıldığı örneklerin gönderildikleri bölümlere göre dağılımı.

Örneklerin Gönderildiği Bölüm	Sayı	%
Dahili Birimler	10	34.5
Cerrahi Birimler	12	41.4
Pediyatri	2	6.9
Anestezi	5	17.2
Toplam	29	100

4.3.2 MBL E-test

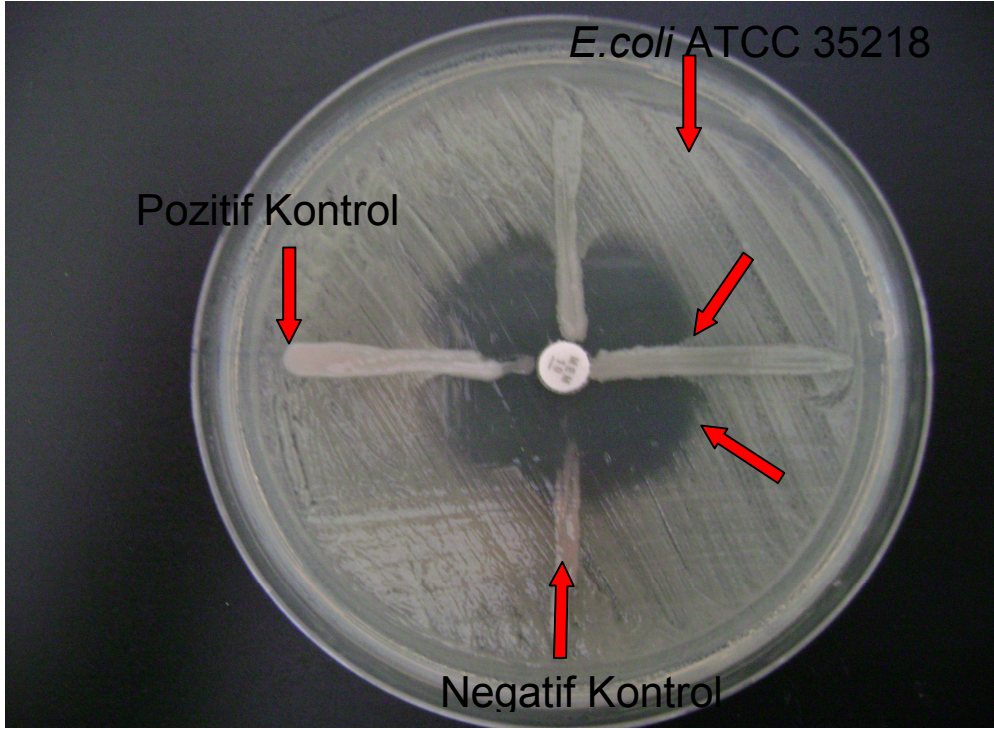
Çalışmaya alınan izolatlarda metallo-beta laktamazın fenotipik tayini amacıyla kullanılan testlerden biri de MBL E-testtir(IMP-EDTA). E-test toplam 29 izolata uygulandı. E-test uygulanan 29 izolatin 6'sının (%20.7) imipenem: imipenem+EDTA MİK oranları ≥ 8 olarak bulundu. MBL pozitif olarak değerlendirilmiş ve fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği saptandı. 29 izolatin 23'ü (%79.3) ise MBL negatif olarak değerlendirildi ve fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretmediği saptandı. E-test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan bir izolat Şekil 1 de gösterilmektedir.

Şekil 1: İmipenem/imipenem+EDTA'lı E-test ile MBL pozitifliği



4.3.4 “Modifiye Hodge Test” (MHT)

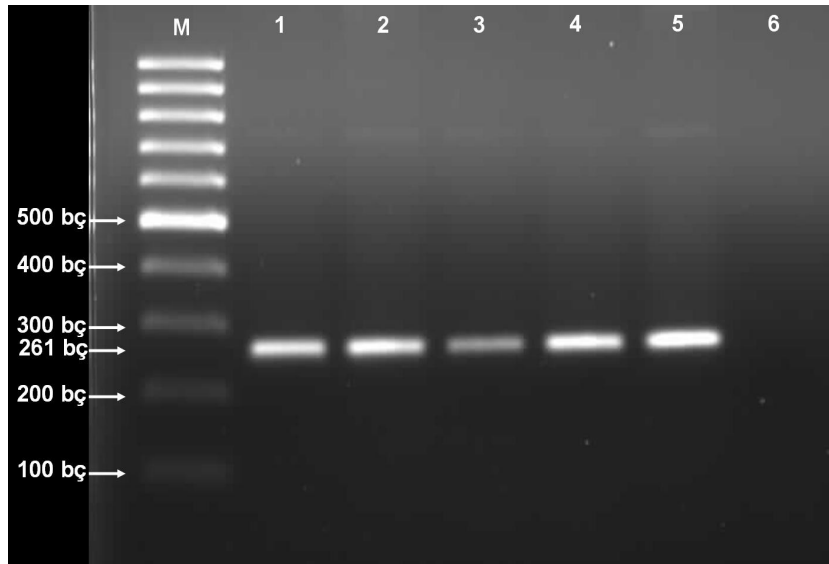
P.aeruginosa izolatında metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde kullanılan diğer bir test MHT'dir. Çalışmaya alınan 29 İzolatların 6 (% 20.7)'si modifiye Hodge testi ile pozitif olarak; 23'ünde (%79.3) modifiye Hodge testi ile negatif bulunmuştur. MHT ile pozitif bulunan altı izolatın altısı da EDTA'lı E-test ile pozitif bulunmuştur.



Şekil 2: Modifiye Hodge testi pozitif olan izolat.(yonca görünümü)

4.4. Metallo-beta-laktamaz Enziminin Genotipik Yöntemle Gösterilmesi

PZR deneyleri sonucunda 11 suшта (%37,9) metallo β laktamaz üretiminden sorumlu VIM-1 gen bölgesi izole edildi. IMP-1, IMP-2 ve VIM-2 gen bölgeleri negatif bulunmuştur. PZR deneyleri sonucunda oluşan bantlar şekil 3'da gösterilmiştir.



Şekil 3: Primer spesifik PZR yöntemi ile metallo β laktamaz üretiminden sorumlu VIM-1 gen bölgesinin %1,5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3, 4, 5: 261 bç'lik VIM-1 gen bölgesi, Kolon 6: Negatif kontrol)

PZR İLE DİĞER TESTLERİN KARŞILAŞTIRMALARI

Tablo 10: MBL E-Test ile PZR Karşılaştırılması

			PZR		Total
			yok	VIM1	
MBL E-Test	NEGATİF	N	18	5	23
		% MBL E-Test	78,3%	21,7%	100,0%
	% PZR	100,0%	45,5%	79,3%	
	POZİTİF	N	0	6	6
		% MBL E-Test	,0%	100,0%	100,0%
% PZR	,0%	54,5%	20,7%		

Total	N	18	11	29
	% MBL E-Test	62,1%	37,9%	100,0%
	% PZR	100,0%	100,0%	100,0%

MBL E-Test ile PZR arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu $p=0,001$

MBL E-Testin duyarlılığı %54 özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. PPD %100, NPĐ %78,2 olarak hesaplanmıştır.(Tablo 10)

Tablo 11: MHT ile PZR Karşılaştırılması

			PZR		Total
			yok	VIM1	
MHT	NEGATİF	N	18	5	23
		% MHT	78,3%	21,7%	100,0%
		% PZR	100,0%	45,5%	79,3%
	POZİTİF	N	0	6	6
		% MHT	,0%	100,0%	100,0%
		% PZR	,0%	54,5%	20,7%
Total		N	18	11	29
		% MHT	62,1%	37,9%	100,0%
		% PZR	100,0%	100,0%	100,0%

MHT ile PZR arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu $p=0,001$

MHT in duyarlılığı %54 özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. PPD %100, NPĐ %78.2 olarak hesaplanmıştır. (Tablo 11) Uygulanan iki test sonuçları arasında %100 uyumluluk saptanmıştır.

Tablo 12: Metallo beta laktamaz geni taşıyan izolatların servis, materyal, MBL E-Test, MHT pozitifliklerine göre dağılımları

SUŞ NO	BÖLÜM	MATERYAL	IMP (MIC) µg /mL	MBL E-Test	MHT	PZR
1	Ortopedi	Doku	16	-	-	VIM-1
2	Ortopedi	Doku	>256	+	+	VIM-1
3	Enfeksiyon	Doku	>256	+	+	VIM-1
5	Enfeksiyon	Apse	>256	+	+	VIM-1
6	Kalp-damar cer.	Doku	>256	+	+	VIM-1
8	Plastik cer.	Doku	>256	+	+	VIM-1
10	Anestezi	Balgam	8	-	-	VIM-1
12	Ortopedi	Doku	8	-	-	VIM-1
14	Enfeksiyon	Doku	8	-	-	VIM-1
19	Kalp-damar cer	TAK	12	-	-	VIM-1
20	Noroloji	İdrar	>256	+	+	VIM-1

5. TARTIŞMA

Pseudomonas cinsi bakteriler toprakta ve suda yaşayan gram negatif, nonfermentatif, aerop basillerdir. *Pseudomonas* cinsi içinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P.aeruginosa* daha çok HE olmak üzere, immün yetmezliği olanlarda, malign veya metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süre kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde en önemli enfeksiyon etkenlerinden biridir.

P. aeruginosa HE etkenleri içinde sık olarak yer almakta, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır^{92,93}.

P.aeruginosa enfeksiyonlarının sıklığı özellikle hastane ortamında daha yüksektir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinden olmak üzere, HE etkeni olarak en sık izole edilen fırsatçı patojenlerden biridir. Genel olarak hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır⁹³. Hastane koşullarında bakteriler hem daha kolay barınma olanağı bulmakta hem de direnç kazanma şansı artmaktadır. *P.aeruginosa* suşlarının etken olduğu enfeksiyonlarda en önemli sorun, antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olmasıdır. Çoklu ilaç direncine sahip *P.aeruginosa* suşları ile gelişen enfeksiyonların tedavisi, klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesidir⁹⁴.

Çalışmamızda klinik örneklerden tanımlanan 29 *P.aeruginosa* izolatının 18'i (%62) çoklu ilaç direncine sahiptir. Çoklu ilaç direncine sahip olduğu belirlenen 18 *P.aeruginosa* izolatının florokinolon grubunda yer alan siprofloksasine, aminoglikozit grubunda yer alan tobramisine ve beta-laktam grubunda yer alan ajanlardan (seftazidim, meropenem, imipenem ve sefaperazon/sulbaktam) en az birine dirençli olduğu belirlenmiştir.

Yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlarda ve çoklu ilaç direnci gösteren gram negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası enzimler her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermekle birlikte her merkez için

değişmeyen bir gerçek, oranların yıllar içinde artmakta olduğudur. Japonya'da karbapenem direnci 1998'de % 19,3'den 2002'de % 38'e çıkmıştır⁹⁵.

Hastanemizde izole edilen *P.aeruginosa* suşları için karbapenem direnci 2010 yılında %24 olarak saptanmıştır⁹¹.

Antibiyotik direnç durumları bölgelere ve hastanelere göre değişiklik gösterdiğinden her hastanede mikroorganizmanın antibiyotik direncinin izlenmesi ve ampirik tedavide bu verilerden faydalanılması gerekir⁹³. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça güçtür çünkü suşlar doğal dirence sahiptir ve aynı zamanda antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirmiştir⁹⁶.

Karbapenem antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalarla direnç gelişebilmektedir: Bakteri dış membran proteinlerinde değişiklik sonucu geçirgenliğin azalması, karbapenemin dışarı pompalanması, AmpC tipi betalaktamazların aşırı üretimi, karbapenemaz üretimi. *P.aeruginosa* tedavi sırasında imipeneme direnç geliştirebilir. Bu direnç seleksiyonu, diğer beta-laktam antibiyotiklerin seleksiyonundan farklı olarak, *P.aeruginosa*'nın imipeneme seçici membran geçirgenliğinde değişiklik meydana gelmesiyle oluşur. Enterobacteriaceae kökenlerinde imipenem direnci kromozomal beta-laktamazların yüksek düzeyde üretilmesi ve geçirgenliğinde azalmaya bağlı olarak ortaya çıkar⁹⁷.

Genel olarak imipenem ve meropenem duyarlılığının birbirine paralel olduğu kabul edilmekte ve CLSI tarafından da her iki karbapenemin antibiyogram değerlendirilmesinde birbirini temsil edebileceği önerilmektedir. Bal ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada gram negatif bakterilerde meropenem ve imipenem duyarlılıklarını eşit oranlarda bulmuşlardır⁹⁸. Ancak, farklı porin veya pompa-efluks sistemleri nedeniyle imipenem ve meropenem birbirinden bağımsız duyarlılıklara sahip olabilirler.

Beta-laktamazlar, beta-laktam antimikrobiyal ajanlarına karşı oluşan bakteriyel direncin en yaygın sebebidir. Beta-laktamazlar için birkaç sınıflandırma sistemi yayınlanmıştır. Beta-laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları ve plazmid ya da kromozomal olarak kodlanmalarına göre sınıflandırılmışlardır⁵⁸.

Sınıf B Metallo-beta-laktamazlar (MBL), karbapenemleri hidroliz edebilen ve çoğu beta-laktamaz inhibitörlerine karşı direnç oluşturan fakat metal iyon şelatörlerinin inhibisyonuna duyarlı olan beta-laktamaz sınıfıdır. Bu enzimlerin

çoğu sefaloprinleri ve penisilinleri hidroliz etme yeteneğinde fakat, aztreonamları hidroliz edememektedir. Hidroliz yetenekleri enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko iyonundan gelmektedir. En sık gözlenen MBL enzimleri VIM, IMP, GIM ve SPM'dir. Bu enzimler kromozomal olmakla birlikte gen kasetlerinde taşınan integronlarda lokalize olmuşlardır. Bu integronlar plazmid veya transpozona integre olduğunda bakteriler arasında mutlaka transferi gerçekleşmektedir. Transfer edilebilir IMP tipi ilk defa 1990 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır. VIM tipi MBL'lar ise ilk defa İtalya'da 1997 yılında rapor edilmiştir. Diğer MBL tipi olan SPM ve GIM çok fazla yayılış göstermemektedirler ancak VIM ve IMP tipi MBL'lar dünya genelinde gittikçe yaygınlaşmakta ve önemli bir sorun oluşturmaktadır⁹⁹.

Tedavilerinde karbapenem antibiyotiklerinin tercih edildiği enfeksiyonlarda etkeni izole etmek kadar etkenin karbapenemaz ve MBL üretimini basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla tespit etmek de önem kazanmaktadır. MBL üreten izolatların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında erken tanısı hem dirençli izolatın yayılmasını önlemek hem de klinisyeni tedavi konusunda bilgilendirebilmek için son derece önemlidir. Bu güne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde MBL enziminin tespitine yönelik çeşitli fenotipik testler uygulanmıştır. Ne varki GSBL (Geniş spektrumlu beta-laktamaz)'larda olduğu gibi CLSI kriterlerine göre izolatlarda MBL üretimini tespit etmede geçerli bir metod henüz oluşturulamamıştır. Ancak double disk sinerji testi, imipenem-EDTA kombine disk testi, MBL E-Test, Modifiye Hodge testi gibi çeşitli yöntemleri kullanan çalışmalar yapılmakta ve sonuçlar PCR sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmaların bazıları olumlu sonuç verirken bazılarında yalancı pozitifliğin yüksek olduğu görülmektedir^{100,101}.

Fenotipik yöntemlerin hemen hepsi, inhibitör maddenin ortama eklenmesi ile enzim inhibisyonunun gözlenmesi temeline dayanır. Yong et al., İmipenem ve İmipenem+EDTA diskleri kullanılarak rutin metallo enzim araştırılması için kullanılabilecek bir yöntemin geliştirildiğini bildirmiştir¹⁰². Farklı betalaktam inhibitör kombinasyonları esasına dayanan fenotipik testler halen rutin test olarak değerlendirme aşamasındadır¹¹³.

Luzzarro ve arkadaşları İtalya'da karbapenem dirençli 82 *P. aeruginosa* izolatında E-test MBL stripleri ile %9,8 oranında MBL üretimi rapor edilmiştir¹⁰³. Ohara ve ark. 58 suşun 14'ünde (%14) MBL pozitif olarak saptamışlardır¹⁰⁴.

Varaiya ve ark. ise 240 *P. aeruginosa* izolatının 60'ını (%25) karbapenem dirençli 50'sini (%20,8) MBL pozitif olarak rapor etmişlerdir¹⁰⁵. Brezilya'da 3 fenotipik yöntemin karşılaştırıldığı araştırmada 69 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 21'i (%30.4) MBL pozitif saptanmıştır¹¹⁰.

SENTRY çalışması kapsamında 1999-2002 yılları arasında İtalya'nın Genova, Roma ve Catania bölgelerinde izole edilen 383 *P.aeruginosa* suşunun %6.5'inin (imipenem dirençli bulunanlardan %39.1'inin) MBL ürettiği saptanmıştır⁹².

Türkiye'de MBL prevalansını yansıtan uluslararası yayınlanmış çalışmalar bulunmaktadır. Altoparlak ve arkadaşları, Erzurum'da karbapenemlere dirençli 40 *P. aeruginosa* suşunun IMP-EDTA kombine disk yöntemi ile 22'sinde (%55) pozitiflik bulmuşlardır¹⁰⁶. Toraman ve arkadaşları Elazığ'da karbapenemlere dirençli 52 *P. aeruginosa* izolatının 15'inde (%29) MBL üretimini tespit etmişlerdir¹⁰⁷. Fırat Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden 407 *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. E-Test-MBL stripleri ile karbapenem dirençli suşlarda MBL araştırması yapılmış ve 42 *P. aeruginosa* suşunun 10'unda (%24) MBL üretimini saptanmıştır¹⁰⁷. Fidan ve arkadaşları çalışılan 40 *P. aeruginosa* suşundan 2'sinde (%5) double disk sinerji ve modifiye hodge testi ile MBL enzimi saptamışlardır¹⁰⁸ İstanbul'da karbapenem dirençli (yirmibeş *Pseudomonas* suşunun % 12'si modifiye Hodge testi ile, % 52'si imipenem-EDTA disk testi ile, % 60'ı meropenem-EDTA disk testi ile pozitiflik vermiştir¹⁰⁰.

Çalışmamızda 29 *P. aeruginosa* izolatu MBL varlığını fenotipik olarak araştırmak amacıyla E-Test MBL stripleri ve modifiye hodge testi ile değerlendirilmiştir ve 29 suşun 6 (20,7%)'sı MBL pozitif olarak saptanmıştır.

Çin'de yapılan bir araştırmada imipenem dirençli 264 *P. aeruginosa* izolatının 24(%9,1)ü PZR ile MBL pozitif saptanmış¹⁰⁹. MBL E-Test ile yanlış pozitif sonuç saptanmamış. MBL E-Test (IMP EDTA) duyarlılık %85,7 özgüllük %100 PPD, %100 ve NPD %98,8 olarak hesaplanmış¹⁰⁹. Brezilya'da 3 fenotipik yöntemin karşılaştırıldığı araştırmada 69 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 53'i (%76,8) MBL E-Test ile pozitif saptanmıştır¹¹⁰.

Benzer şekilde bizim araştırmamızda MBL E-Test (IMP EDTA) ile 6 (%20,7) saptanmıştır. MBL E-Test (IMP EDTA) ile duyarlılık %54 özgüllük

%100, PPD %100 ve NPD%78 olarak hesaplanmıştır. MBL pozitif olduğu halde MBL E Test ile negatif saptanan 5 *P. aeruginosa* izolatı gösterilmiştir.

Araştırmamıza göre MBL sıklığının %37,9'lık bir yüzdeye sahipken, Dünya genelinde MBL enziminin saptanma sıklığının %8,7-15'lik ülkemizde ise %5-55'lik bir yüzdeye sahip olduğu gözlenmektedir. MBL enzimi, çalışmamızda olduğu kadar diğer araştırmalarda da giderek artan bir tehlike olduğu belirtilmektedir ve bu durum antibiyotik tedavisi sırasında gelişen MBL direnç sorununu tekrar güncelleştirmektedir. Dolayısı ile farklı coğrafyalarda MBL enziminin saptanma yüzdesi değişiklik göstermektedir.

Plazmidik MBL'lar son birkaç yılda dünya genelinde hızlanan yayılmaları ile gündemde yer tutmaktadır. Özellikle, Non Fermentatif Gram Negatif basillerde IMP veya VIM tipi MBL'ların yayılması 2 nedenle epidemiyolojik risk oluşturur. Birincisi, MBL'lar sadece karbapenemlere değil tüm beta-laktamlara direnç oluşturabilir ve beraberinde taşınabilen diğer direnç genleriyle aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı da çoklu direnç gösterebilirler. İkincisi, IMP veya VIM tipi enzimleri kodlayan genler sıklıkla hareketli elemanlar üzerinde taşındıklarından farklı suşlar arasında horizontal olarak yayılabilirler¹⁰³.

Şimdiye kadar IMP, VIM, SPM- 1 ve GIM-1 olmak üzere dört farklı grup altında toplanan metallo-betalaktamazlardan en fazla IMP ve VIM tipi enzimler saptanmaktadır. IMP tipi enzimler *P.aeruginosa*'nın yanı sıra enterik bakterilerde de bulunmakta iken, VIM benzeri enzimler *P.aeruginosa* ve diğer non-fermentatif bakterilerde bulunmaktadır¹⁰³.

Bu fenotipik yöntemlerin sonuçlarını değerlendirirken, o merkezlerdeki MBL tiplerini ve prevalanslarını da dikkate almak gerekir. IMP tipi MBL'lar 1997'ye kadar Japonya ile sınırlı kaldıktan sonra Avrupa ülkelerinde de saptanmaya başlamıştır. VIM tipi MBL'lar Avrupa orijinli olmakla birlikte bugüne kadar 20 den fazla ülkeden bildirilmiştir.

IMP-1 ilk olarak 1990'ların başlarında bildirilirken yeni MBL genleri *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. ve Enterobacteriaceae üyeleri gibi birçok önemli patojende bildirilmektedir. IMP-1'in ortaya çıkmasından sonra VIM ailesi, SPM-1, GIM-1 ve SIM-1 olmak üzere dört tip MBL daha bildirilmiştir. SPM-1 Brezilya, GIM-1 Almanya ve SIM-1 Kore ile sınırlı iken IMP tipi MBL'ler

Uzakdoğu, Avrupa ve Kanada'da; VIM tipi MBL'ler Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avrupa ve Güney Doğu Asya'da yayılım göstermektedir^{75,83,86}.

Uzak Doğu'nun dışında dünyanın diğer bölgelerinde *P.aeruginosa* klinik izolatlarında MBL üretimi daha ender olmasına rağmen Brezilya ve diğer Latin Amerika ülkelerinde bu direnç mekanizması yaygın olarak görülmektedir. Sao Paulo'da bir *P.aeruginosa* izolatında ilk kez SPM-1'in bildirilmesinden sonra bu enzim Brezilya'da yaygınlaşmıştır. Brezilya'da 2000-2001 yılları arasında toplanan 183 *P.aeruginosa* izolatında %55.6 oranında SPM-1, %30.6 oranında VIM-2 ve %8.3 oranında da IMP-1 bulunmuştur^{83,84}.

SENTRY çalışmasının Latin Amerika merkezlerinden Arjantin, Brezilya, Şili, Meksika ve Venezuela'da Ocak 2001-Aralık 2003 arasında izole edilmiş 463 *Acinetobacter* spp., 1186 *P.aeruginosa* ve beş *P.fluorescens* örneği incelenmiştir. Yirmibir (%1.77) *P.aeruginosa* SPM-1, yedi (%1.51) *Acinetobacter* spp. ve bir (%20) *P.fluorescens* IMP-1, üç *P.aeruginosa* ve bir *P.fluorescens* VIM-2 varlığı açısından pozitif bulunmuşlardır. İlk IMP-16 varyantı da bu çalışmada bulunmuştur¹¹⁶.

Japonya'da 1991'den beri IMP-1 *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin de içinde bulunduğu gram negatif çomaklar arasında giderek yaygınlaşmıştır. Yine Japonya'da 1996-1997 yılları arasındaki bir çalışmanın sonuçlarına göre *P.aeruginosa* izolatlarının %1.3'ünün ve *S.marcescens* izolatlarının %4.4'ünün plazmid kaynaklı IMP-1 ürettikleri saptanmıştır¹¹¹.

Kanada'da 1995-1996 yılları arasında Gibb ve ark.'nın¹¹² yaptığı çalışmada iki ayrı rehabilitasyon servisinden dokuz hastada karbapenemlere, aminoglikozidlere, siprofloksasine ve seftazidime dirençli ancak piperasiline duyarlı *P.aeruginosa* izolatları bulunmuştur. Yapılan çalışmaların sonucunda bu izolatların IMP-1 ile %91 oranında benzerlik gösteren IMP-7 beta laktamazına sahip oldukları saptanmıştır. Son 10 yılda Japonya'da ve Çin'de *P.aeruginosa*'da yaygın olan fakat Avrupa ve Kanada'da da görülen IMP-tipi enzimler artan oranlarda tanımlanmaya başlanmıştır⁸³.

Ülkemizde ilk IMP-1 enzimi bir *K.pneumoniae* suşunda bulunmuştur¹¹⁴.

VIM tipi enzimler Avrupa ve Güneydoğu Asya'da izole edilen suşlarda yaygındırlar. Avrupa'da ilk MBL olarak VIM-1 İtalya'dan; daha sonra VIM-2 Fransa, Yunanistan, İtalya ve İspanya'dan, ayrıca Kore'den; VIM-2 ve VIM-3

Tayland'dan ve VIM-4 Yunanistan'dan bildirilmiştir^{81,115}. VIM-1 ile VIM-2 arasında %90 aminoasit benzerliği bulunmaktadır¹¹⁵. VIM tipi MBL'ler çoğunlukla *P.aeruginosa*, *P.putida*, *P.stutzeri*, *Acinetobacter spp.*, *Achromobacter xylosoxidans* ve *S.marcescens*'te bulunmaktadır¹¹⁷.

2002 yılında SENTRY çalışmasına bağlı olarak Walsh ve ark.⁸¹ Polonya'da bir yenidoğanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* suşunun VIM-2 tipi MBL ürettiğini saptamışlardır. VIM-2 enzimi Batı Avrupa'dan bildirilen ilk MBL olmamakla birlikte bu sonuç MBL varlığının Avrupa kıtasına yayıldığını işaret etmektedir.

VIM-2, VIM ailesinin dominant tipidir ve Avrupa'nın birçok ülkesinde izole edilmektedir¹¹⁸.

Ülkemizde Bahar ve ark.¹¹⁹ imipeneme dirençli bir *P.aeruginosa* suşundan VIM-5 izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise (%37.9) VIM-1 pozitifliğine rastlanmıştır.

En çok bilinen ve en çok araştırılan metallo beta laktamazlar VIM 1 gen ailesidir. 27 çeşidi ile 23 ayrı gram negatif basillerden 40 dan fazla ülkede izole edilmiştir. VIM varyantlarında amino asit benzerliği %72.9 ila %99.6 oranlarındadır. Çoğu *blaVIM* hızlı kazanılabilen genetik bölge olan clas 1 integronda taşınır. İntegronlar transpozonlar içinde yer alırlar ama zaman içinde daha hızlı genetik geçiş yapan plazmidler ile de taşınabilirler.Çoğu izolatta diğer direnç genleri ile birlikte bulunurlar¹²⁰.

Meksikada yapılan araştırmada 86 karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatları MBL aktivasyonu için araştırılmış ve *blaVIM-2* ve *blaIMP-15* genleri bulunan klas 1 integronlar saptanmış.Bu çalışma karbapenem direncinin yayılmasını önlemek için uygun gözetim gerekliliğini vurgulayan tek bir *P.aeruginosa* suşunda farklı MBL üreten 2 gen bölgesinin bulunabildiğini gösteren ilk bildiri olmuştur¹²¹.

Metallo-beta-laktamaz gen varlığının önemi, karbapenemler dahil olmak üzere hem pek çok antibiyotiğe direnç gelişimine neden olması, hem de direnç genlerinin horizontal yayılım ile diğer bakterilere kolaylıkla geçebilmesidir¹⁰³.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarına ve diğer literatürlerin verilerine göre Dünya genelinde klinik örneklerden çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* izolasyonunun giderek artan bir trend izlediği görülmektedir. *P.aeruginosa*'nın klinik materyallerden artan izolasyon sıklığıyla birlikte antibiyotik direnç profillerinin de değiştiği görülmektedir. Hastane izolatları arasında giderek daha yüksek oranda çoklu ilaç direncinin izolatlar arasında artış göstermesi, hastane kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının takip edilmesini gerektirmektedir. Bu sayede uygun tedavinin uygulanması mümkün olabilecektir.

Çalışmamız sonucunda, *P. aeruginosa*' da MBL'ların hızla yayılması ve EUCAST standartlarına göre değerlendirilen duyarlılık testlerinde, bunların karbapenemlere duyarlı görülebilmesi nedeniyle, GSBL için olduğu gibi, MBL üretimini de ortaya koyacak daha iyi standardize edilmiş ve değerlendirme kriterleri belirlenmiş fenotipik testlere ve bu testlerin genotipik olarak doğrulanmasına yönelik çalışmalara gereksinim olduğu görüşüne varılmıştır. Bundan sonraki en önemli hedef bu enzimleri tanımlayabilecek duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testlerin geliştirilmesi için araştırmaların devam etmesi olmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Teresa C. Horan, Mary Andrus, Margaret A. Dudeck CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting *American Journal of Infection Control*, Volume 36 Issue 5, June 2008, Page 309-332
2. Jones RN. Nozokomiyal patojenler arasındaki direnç modelleri: Son üç yıl içindeki eğilimler. *Chest*, 2001; 119: 438-441.
3. Zararsız H. Hastane infeksiyonu etkeni Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 1998.
4. Bilgehan A, Kayabaş Ü. Yoğun bakım birimlerinde infeksiyon sorunu. *Klimik Dergisi*, 2001;14 (2): 83-87.
5. The Turkish Antimicrobial Resistance Study Group, Pfaller MA, Korten V, Jones RN, Doern Gary. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for seven broad-spectrum beta-lactams in Turkey using the E-test method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 35: 65-73.
6. Murray BE. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J Infect Dis*, 1991; 163:1185-1194.
7. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ. CDC Definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: A modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1992;13: 606-608.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC. CDC definitions for nosocomial infections. *J Infect Control*, 1988; 16:128-40.

9. Murray PR, Baron BJ, Pfaller MA, Jorgensen JH. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th, Washington: ASM Press, 2003: 209-210.
10. Fridkin SK, Welbel SF, Weinstein RA. Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit. *Infect Dis Clin North Am*, 1997; 11: 479-496.
11. Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klimik Dergisi*; 2001;14: 47-55
12. Yalçın NA. Nozokomiyal Gram-negatif çomak infeksiyonları. *Klimik Dergisi*, 2000; 13:23-25.
13. Doğanay M. Nozokomiyal bakteriyemilerde tedavi. *Klimik Dergisi*; 2000;13:16-18
14. Eickhoff TC. Antibiotics and nosocomial infections. Bennet JV, Brachman PS. *Hospital Infections*. 4th. Ed, Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 1998: 201-213.
15. Pekşen Y. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, 1. Baskı. İstanbul: Simad Yayınları, 2002: 199-209.
16. Erdem B. Hastane infeksiyonlarına yol açan bakteriler. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Basımevi, 1999: 733-737.
17. Larson E, Horan T, Cooper B, Kotilainen HR, Landry S, Terry B. Study of the definition of nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1991; 19: 259-267.
18. Özsüt H. Hastane kaynaklı üriner sistem infeksiyonları. Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, 1. Baskı. İstanbul: Simad Yayınları, 2002: 249-259.

- 19.** Ulusoy S. Hastane kaynaklı pnömoniler. Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, 1. Baskı. İstanbul: Simad Yayınları, 2002: 261-268.
- 20.** Malazgirt Z. Cerrahi yara infeksiyonları. Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları,1. Baskı. İstanbul: Simad Yayınları, 2002: 255-259.
- 21.** Eroğlu C. Hastane İnfeksiyonları. İnfeksiyon, 2001. Erişim: (www.omu.edu.tr/~hakan/ders/17HAST2001.pdf).Erişim tarihi: 2001.
- 22.** Wagner MB, Silva NB, Vinciprova AR, Becker AB, Burtet LM, Hall AJ. Hospital-acquired infections among surgical patients in a brazilian hospital. *J Hosp Infect*, 1997; 35: 277-285.
- 23.** Edmond MB, Wenzel RP. Nosokomial Infections. Mandell GL, Bennet JE,Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th. Ed, New York, Churchill Livingstone Inc, 2010: 3323-3421.
- 24.** Öztürk R. Damar içi katater infeksiyonları. Günaydın M, Esen Ş,Saniç, Leblebicioğlu H. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*, 1. Baskı. İstanbul: Simad Yayınları, 2002: 225-247.
- 25.** Babini G, Livermore DM. Antimicrobial resistance among Klebsiella spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 183-189.
- 26.** Ferraro MJ, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, Hindler JF , Sheehan DJ, Tenover FC, Tunidge JD, Weinstein MP, Wikler MA, Zimmer BL. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antibiyotik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları. Çeviri editörü: Gür D. Ankara; Bilimsel Tıp Yayınevi, 2005; 25: 34-42.
- 27.** Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. İzmir: Barış Yayınevi; 1995. pp.161-172.

- 28.** Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic Microbiology. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 1990.pp.148-386.
- 29.** Çıragil P, Söyletir G, Şener B, Erturan Z. Kistik fibroz ve diğer alt solunum yolu infeksiyonlarında izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 33: 197-202.
- 30.** Erdem B. Pseudomonaslar. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. pp.551-571.
- 31.** Vahaboğlu H, Akhan SÇ. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. pp.1608-1024.
- 32.** Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical Microbiology. Stamford: Twenty-First Edition; 1998.pp.231-236.
- 33.** May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, Devault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Mısra TK, Chakrabarty AM. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 191-206.
- 34.** Otkun M. Diğer Enterik bakteriler ve *Pseudomonas* türleri. İçinde Serter D, Ertem E, Gökengin D. Editörler. Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevi:1998. pp.253-263.
- 35.** Delden CU, Iglewski BH. Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg Infect Dis 1998; 4: 551-560.
- 36.** Bergman U, Scheffer J, Koller M, Schonfeld W, Erbs G, Müller FE, König W. Induction of inflammatory mediators (histamin and leukotrienes) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by *Pseudomonas aeruginosa* strains from burn patients. Infect Immun 1989; 57: 2187-2195.

- 37.** Que VJ, Woods DE. Alteration of lung structure and function by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol Immunopathol Res* 1987; 6: 93-102.
- 38.** Colin D, Louis D, Bernillon J, Guinand M, Wallache J, Las A. Alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS Immun Med Microbiol* 1997; 18: 175-184.
- 39.** Wick MJ, Frank DW, Storey DG, Iflewski BH. Identification of Reg B, a gene required for optimal exotoxin A yields in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 489-497.
- 40.** Woods DE, Sokol PA, Bryan LE, Storey DG, Mattingly SJ, Vogel HJ, Ceri H. In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis* 1991; 163: 143-149.
- 41.** Sokol PA, Iglewski BH, Hager TA, Sadoff JC, Cross AS, Mc Manus A, Ferber BF, Iflewski WJ. Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1981; 34: 147-153.
- 42.** Woods DE, Sokol PA. Use of transposon mutants to assess the role of exoenzymes S in chronic pulmonary disease due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4: 163-169.
- 43.** Yagcı A, Tunc Y, Soyletir G. Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comparison of two procedures. *New Microbiol* 2002; 25: 223-229.
- 44.** Morihara K, Tsuzuki H. Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. *Infect Immun* 1997; 3: 679-685.
- 45.** Wretling B, Paulovskis OR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infection. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 998-1004.

- 46.** Denton M, Wilcox MH. Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 468-474.
- 47.** Doig P, Paranchych W, Sastry PA, Irvin RT. Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity. *Can J Microbiol* 1989; 35: 1141-1145.
- 48.** Pitt TL. Lipopolysaccharide and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* 1989;42:1-7
- 49.** Gülay Z, Taşkıran Aİ, Kaplan O, Saylak MÖ. Beta-laktamazlar. *DEU Tıp Fak Derg* 2001; 12: 343-358. *Antimicrob Chemother* 1989; 42: 1-7.
- 50.** Andrade, S.S., Jones, R.N, Gales, A.C., Sader H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1997-2001). *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, 140-147, 2003.
- 51.** Pai, H., Kim, J., Lee, J.H., Choe K.W., Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 480-484, 2001.
- 52.** Yoon SS, Cookley R, Lau GW, Lyman SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang SH, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hasset DJ. Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conduction. *J Clin Invest* 2006; 116: 436-446.
- 53.** Bal Ç. Toplum kökenli infeksiyonlarda gram negatif çomak direnci. *Ankem Derg* 2006; 20: 278-281.
- 54.** Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. *Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumda Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi* 2002; 31: 83-100.

- 55.** Wolter, D., Hanson, N.D., Lister, P.D. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol. Letters*, 236, 137-143, 2004.
- 56.** Livermore, D. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2046-2048, 1992
- 57.** Gür D. β -laktamazların sınıflandırılması. *Flora* 1996; 2: 80-86.
- 58.** Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
- 59.** Moellering RC. Meeting the challenges of beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 1-8.
- 60.** Bal Ç. Beta-laktamazlar: güncel durum. *Flora* 2003; 8: 111-23.
- 61.** Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2488-2493.
- 62.** Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
- 63.** Matthew M, Harris A, Marshall M, Boss G. The use of analytical isoelectrik focusing for detection and identification of beta-lactamases *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-178.
- 64.** Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085-1089.
- 65.** Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.

- 66.** G6r D. Hastane infeksiyonlarında 6nem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere diren6 mekanizmaları. Hastane 6nfeksiyonlarđ Dergisi 1997;1:38-45.
- 67.** Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24,19-45.
- 68.** Yulun N. Beta-laktamazlar ve Klinik A6ıdan 6nemi. ANKEM Derg 1997;11:205-7.
- 69.** 6zsoy FM, 6nc6l O, Y6ld6r6m A, Pahsa A. Geni6letilmi6 spektrumlu Beta-laktamazlar: Klinik 6nemi ve getirdi6i sorunlar. Flora dergisi, 2001; 6: 3-21
- 70.** Yıldıırım A. Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) Araştırma Y6ntemlerinin Karşılaştırılması: E.coli ve Klebsiella spp. suşlarında Sıklı6ının Saptanması. Uzmanlık tezi, G6lhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul, 1999.
- 71.** Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-6-lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
- 72.** Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-6-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-5413.
- 73.** Kaygusuz A, 6ngen B, G6rler N, T6reci K. İmipenem diren6li Pseudomonas suşlarında saptanan diren6 mekanizmaları. *Ankem Derg* 1998; 12: 56-62.
- 74.** Murpy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-6-lactamase SPM-1 from Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 582-587.
- 75.** Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla* (SIM-1), in a class 1

integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485-4491.

76. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014-2016.

77. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. IMP-12, a New plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522-1528.

78. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach AC, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-679.

79. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*IMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-1b'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4693-4702.

80. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. First isolation of *bla*VIM-2 in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-1434.

81. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europa: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116-119.

82. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-

β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/ VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5153-5156.

83. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*SPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1406-1409.

84. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamase produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 63-82.

85. Murpy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:582-587.

86. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-4661.

87. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) *MIC breakpoints – the reference for routine susceptibility testing methods* ECCMID 2010

88. Walsh, T., Bolmström, A., Qwarmström, A., Gales, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2755-2759, 2002.

89. Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7, 88-102, 2001.

90. Sajduda A, Brzostek A, Popławska M, Augustynowicz-Kopec´ E, Zwolska Z, Niemann S, Dziadek J, Hillemann D. Molecular Characterization of Rifampin

and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Poland. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42(6):2425-2431.

91. Ulusal Hastane Enfeksiyonu Surveyans Ağı 2010 MEU Tıp Fak Araş.ve Uygulama Hast. verileri <http://hastaneenfeksiyonlari.rshm.gov.tr/index.php>

92. Toleman, A.M., Biedenbach, D., Bennet, D., Jones, R., Walsh, T., 2005, Italian metallo- β -lactamases: A national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, p. 61-70.

93. Gültekin, B., Eyigör, M., Aydın, N., 2004, Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci, *ANKEM Derg.*, 18 (1):1-4.

94. Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. *Pseudomonas* and related microorganism, "Medical Microbiology" (Ed. P.R Murray, K. Rosenthal, G.S. Kobayashi, M.A. Pfaller)'de 3. baskı, Mosby, St. Louis-Missouri, s. 258-265, 1998.

95. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo- β -lactamase- mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005;41:S276-8.

96. Strateva, T., Ouzounova-Raykova, V., Marova, B., Todorova, A., Marteva, Y., Mitov, I., 2007, Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanism, *Journal of Medical Microbiology*, 56, p. 956-963.

97. Champs C, Henguell C, Guelon D, et al. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. *J Clin Microbiol* 1993;31(1):123-7.

- 98.** Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE, Anđ Ö. Çođul dirençli Klebsiella pneumonia suşlarında plazmidik sefamisinaz CMY 2. İnfeks Derg 1995;9(1-2):67-9.
- 99.** Oueenan M., Bush, K., 2007, Carbepenemases: Versalite β -Lactamases, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 20, No. 3, p. 440-458.
- 100.** Sarı, H., 2005, Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/ meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta-laktamaz varlığının (MBL) araştırılması, istanbul, Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniđi, Uzmanlık Tezi.
- 101.** Çakar, A., 2005, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi’de ayrıştırılan Pseudomonas aeruginosa izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi.
- 102.** Yong, D., Lee, K., Yum, J., Shin, H., Rossolini, G., Chong Y., 2002, Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo-beta lactamase producing clinical isolates of Pseudomonas spp. And Acinetobacter sp., Journal of Clinical Microbiology, Vol. 40, No.10, p. 3798-3801.
- 103.** Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, et al. Prevalance and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. Diag Microbiol Infect Dis 2004;48(2):131-5.
- 104.** Ohara, M., Kouda, S., Onodera, M., Yoshihiro, F., Sasaki, M., Kohara, T., Kashiyama, S., Hayashida, S., Kadono, M., Komatsuzawa, H., Gotoh, N., Usui, T., Hideyuki, I., Kuwabara, T., Yokoyama, T., Sugai, M., 2007, Molecular Characterization of Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in Hiroshima, Japan, Microbiol. Immunol., 51 (3), p. 271-277.
- 105.** Varaiya, A., Kulkarni, N., Kulkarni, M., Bhalekar, P., & Dogra, J., 2008, Incidence of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients, Indian J. Med. Res. p. 398-402.

- 106.** Altoparlak, U., Akta_, F., Celebi, D., Ozturk, Z., Akcay, MN., 2005, Prevalence of Metallo-Beta-Lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these Isolates, PMID: 16129224 (Pubmed), 31:707-10.
- 107.** Toraman, Z., Yakupo_ulları, Y., Kizirgil, A., 2005, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında Metallo-Beta-laktamaz araştırılması, *Infeksiyon Dergisi*, 19 (1): 101-105.
- 108.** Fidan, I., Gürelik, F., Yüksel, S., Sultan, N., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve Metallo-_ - Laktamaz sıklığı, *Ankem Derg.*, 19 (2):68-70.
- 109.** Qu TT, Zhang JL, Wang J, Tao J, Yu YS, Chen YG, Zhou JY, Li LJ. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* 2009 Apr;47(4):1136-42. Epub 2009 Feb 11
- 110.** Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. . *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65(9):825-9.
- 111.** Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
- 112.** Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MFI, Woodfard N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-258.
- 113.** Varsha Gupta Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species *Expert Opin Investig Drugs*. February 2008, Vol. 17, No. 2 , Pages 131-143

- 114.** Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 695-696.
- 115.** Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
- 116.** Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Inter J Antimicrob Agents* 2005; 25: 57-61.
- 117.** Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Briand YM, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-969.
- 118.** Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DMC, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 61-70.
- 119.** Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 282-283.
- 120.** Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol.* 2011 Mar;6:317-33
- 121.** Quinones-Falconi F., Galicia-Velasco M., Marchiaro P., Mussi M. A., Ballerini V., Vila A. J., Viale A. M., Bermejo-Morales K. and Limansky A. S. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 126–131

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDC	Centers for Disease Control
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CAE	Cerrahi Alan Enfeksiyonları
ÇİD	Çoklu İlaç Direnci
EDTA	Etilen daimin tetraasetik asit
ESBL	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HE	Hastane Enfeksiyonu
HKP	Hastane kaynaklı pnömoniler
IEF	İzoelektrik nokta tayini
MBL	Metallo-beta-laktamaz
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton sıvı besiyeri
MHT	Modifiye Hodge testlerini
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MPA	Merkaptopropionik asit
NFGN	Non Fermentatif Gram Negatif
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
YBÜ	Yoğun bakım üniteleri
PPD	Pozitif Prediktif Değer
NPD	Negatif Prediktif Değer

TABLolar

Tablo 1: Hastane enfeksiyonları için predispozan risk faktörleri ¹⁰	11
Tablo 2: Hastane enfeksiyonlarının endemik ve epidemik görülme sıklığı	12
Tablo 3: Hastane enfeksiyon etkenlerin endemik ve epidemik görülme sıklığı	13
Tablo 4: Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri.....	25
Tablo 5: İmipenem ve meropenemin Enterobacteriaceae ve nonfermentatif GN bakteriler için EUCAST referans değerlerine göre MİK değerleri	31
Tablo 6: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerine spesifik primer dizileri ⁹¹	33
Tablo 7: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerinin PZR reaksiyon karışımı	34
Tablo 8: Metallo β laktamaz üretiminden sorumlu IMP-1, IMP-2, VIM-1 ve VIM-2 gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	35
Tablo 9: Çalışmaya alınan <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının ayrıştırıldığı örneklerin gönderildikleri bölümlere göre dağılımı.....	37
Tablo 10: MBL E-Test ile PZR Karşılaştırılması	40
Tablo 11: MHT ile PZR Karşılaştırılması	41
Tablo 12: Metallo beta laktamaz geni taşıyan izolatların servis, materyal, MBL E-Test, MHT pozitifliklerine göre dağılımları	42

ŞEKİLLER

- Şekil 1:** İmipenem/imipenem+EDTA'lı E-test ile MBL pozitifliği..... 38
- Şekil 2:** Modifiye Hodge testi pozitif olan izolat.(yonca görünümü)..... 39
- Şekil 3:** Primer spesifik PZR yöntemi ile metallo β laktamaz üretiminden sorumlu VIM-1 gen bölgesinin %1,5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: DNA moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3, 4, 5: 261 bç'lik VIM-1 gen bölgesi, Kolon 6: Negatif kontrol)..... 40

GRAFİKLER

- Grafik 1:** İzole edilen P.aeruginosa suşlarının klinik örneklere göre dağılımı... 37