



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
KÖKENLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU, METALLO VE AMPC
TİPİ BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI, AMPC TİPİ
BETA LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN GENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Özgür PAŞA
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Burçin ÖZER**

HATAY-2013

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
KÖKENLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU, METALLO VE AMPC
TİPİ BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI, AMPC TİPİ
BETA LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN GENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Özgür PAŞA
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Burçin ÖZER**

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Uzmanlık Grubu tarafından 1204U0106/2012
proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Adı: KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
PSEUDOMONAS AERUGINOSA KÖKENLERİNDE
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU, METALLO VE AMPC TİPİ
BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI,
AMPC TİPİ BETA LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN GENOTİPİK
OLARAK SAPTANMASI**

Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. Özgür PAŞA

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....

.....
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Nizami DURAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....

Doç. Dr. Burçin ÖZER
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ

1. Doç. Dr. Nizami DURAN
2. Doç. Dr. Burçin ÖZER
3. Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN
4. Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ
5. Yrd. Doç. Dr. Erkan YULA

I. İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
II. TABLO LİSTESİ.....	v
III. GRAFİK VE RESİM LİSTESİ.....	vi
IV. KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
V. İTHAF.....	viii
VI. TEŞEKKÜR.....	ix
VII. ÖZET.....	x
VIII. ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.4. Virulans ve Patojenite Özellikleri.....	6
2.5. Dirençlilik.....	9
2.6. Antijenik Yapı.....	9
2.7. Plazmidleri, Fajları, Bakteriyosinleri.....	9
2.8. Patogenez.....	10
2.9. Yaptığı Hastalıklar.....	10
2.10. Laboratuvar Tanısı.....	13
2.11. Tedavi.....	14
2.12. Korunma ve Kontrol.....	14
2.13. <i>P.aeruginosa</i> 'da Antimikrobiyal Direnç.....	14
2.13.1. Beta Laktamaz Üretimine Bağlı Beta Laktam Direnci.....	16
2.13.2. Aktif Dışa Atıma Bağlı Beta Laktamlara Direnç.....	27
2.13.3. Dış Membran Geçirgenliğinin Değişmesine Bağlı Gelişen Beta Laktam Direnci.....	29
2.13.4. Hedefteki Değişikliğe Bağlı Gelişen Beta Laktam Direnci	29
2.13.5. Aminoglikozid Direnç Mekanizmaları.....	29
2.13.6. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları.....	30
2.14. Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri.....	30
2.14.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri...	30
2.14.2. Metallo Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri.....	35
2.14.3. AmpC Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri.....	36
3. MATERYAL VE METOD.....	39
3.1. Bakteri Kökenleri.....	39
3.2. Bakterilerin Klinik Örneklerden İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	39

3.3. Çalışmada Kullanılan Materyaller.....	40
3.3.1. Kanlı Agar.....	40
3.3.2. Eosin Methylene Blue Agar.....	40
3.3.3. Mueller-Hinton Agar.....	40
3.3.4. Mueller-Hinton Broth.....	40
3.3.5. Tryptic Soy Broth.....	41
3.3.6. Triple Sugar Iron Agar.....	41
3.3.7. SIM Besiyeri.....	41
3.3.8. Lysine Iron Agar.....	41
3.3.9. Beyin Kalp İnfüzyon Agar.....	41
3.3.10. Fosfat Tamponlu Su.....	41
3.3.11. Oksidaz Ayıracağı.....	42
3.3.12. Agaroz Jel.....	42
3.4. Metod.....	42
3.4.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Kombine Disk Doğrulama Testi.....	42
3.4.2. Metallo Beta Laktamaz Varlığının E-Test Yöntemi ile Araştırılması.....	43
3.4.3. AmpC Tipi Beta Laktamaz Varlığının Disk İndüksiyon Testi ile Araştırılması.....	44
3.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile <i>AmpC</i> Geni Varlığının Araştırılması.....	46
3.5. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR.....	70
8. ÖZGEÇMİŞ.....	86

II. TABLO LİSTESİ

Tablo no		Sayfa no
Tablo 1	<i>P.aeruginosa</i> 'nın virulans faktörleri, rolleri ve kontrolü.....	8
Tablo 2	Beta-laktamazların sınıflandırılması.....	19
Tablo 3	Gram Negatif Bakterilerde AmpC Beta Laktamaz İndüksiyonu İçin Gereken Proteinler.....	22
Tablo 4	Efluks sistemleri ve kullandıkları sustratlar.....	28
Tablo 5	GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri.....	33
Tablo 6	GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri.....	34
Tablo 7	Kullanılan Primer.....	47
Tablo 8	<i>P.aeruginosa</i> kökenlerine karşı 10 antibiyotiğin µg/ml cinsinden minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri.....	52
Tablo 9	CAZ/CZC KDDT ile saptanan GSBL varlığı ve antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki.....	53
Tablo 10	DİT yöntemiyle saptanan AmpC beta laktamaz varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki.....	55
Tablo 11	PZR yöntemiyle saptanan <i>AmpC</i> geni varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki.....	56
Tablo 12	PZR yöntemi ile saptanan <i>AmpC</i> geni varlığı ve DİT ile saptanan AmpC beta laktamaz varlığının karşılaştırılması.....	57
Tablo 13	Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda <i>P.aeruginosa</i> suşlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları (%).....	59

III. GRAFİK ve RESİM LİSTESİ

Grafik no		Sayfa no
Grafik 1	Kökenlerin izole edildiği örneklerin gönderildiği klinikler.....	49
Grafik 2	Çalışmada değerlendirilen örneklerin dağılımı.....	50
Grafik 3	Kökenlerin antibiyotiklere direnç ve duyarlılık oranları.....	51

Resim no		Sayfa no
Resim 1	Kromozomal AmpC beta laktamaz indüksiyon mekanizması.....	23
Resim 2	Seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit kombine disk doğrulama testi.....	43
Resim 3	Metallo beta laktamaz varlığının E-test yöntemiyle saptanması.....	44
Resim 4	AmpC beta laktamaz varlığının disk indüksiyon testi ile saptanması.....	45
Resim 5	Konstitütif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif köken.....	45
Resim 6	Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	48

IV. KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ATCC	: American Type Culture Collection
CAZ/CZC	: Seftazidim-seftazidim/klavulanik asit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇDST	: Çift Disk Sinerji Testi
DİT	: Disk İndüksiyon Testi
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EF2	: Elongasyon Faktör 2
EMB	: Eosin Methylene Blue
ExoA	: Ekzoenzim A
ExoS	: Ekzoenzim S
FTS	: Fosfat Tamponlu Su
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
H₂S	: Hidrojen sülfür
İBL	: İndüklenebilir Beta Laktamaz
KDDT	: Kombine Disk Doğrulama Testi
LCR	: Ligase Chain Reaction
MBL	: Metallo Beta Laktamaz
MDR	: Multi Drug Resistant
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MPA	: Merkaptopropionik asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QRDR	: Qinolone-Resistant-Determine-Region
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RND	: Resistance-Nodulation-Cell Division
SMA	: Merkaptometik asit
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
SSCP	: Single-Strand Conformational Polymorphism
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TSİ	: Triple Sugar Iron
bp	: Base pair
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

V. İTHAF

BUGÜNLERE GELMEMDE EMEĞİ GEÇEN HERKESE...

VI. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde çok emeği geçen, güleryüzlü, fedakarlığı, iyi niyeti, hayata pozitif bakış açısı hiç eksik olmayan, tüm sorunlarımı paylaştığım, tecrübesiyle her zaman yoluma ışık tutan, tez konumun belirlenmesi ve diğer her aşamasında sürekli yardımcı olan ve desteğini bir an bile olsun esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Burçin ÖZER'e, eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm sevgi ve hoşgörüsünü benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden sürekli faydalandığım, bir abiye ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Doç. Dr. Nizami DURAN'a, Anabilim Dalımız öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Meryem ÇETİN, Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ ve Yrd. Doç. Dr. Erkan YULA hocalarıma çok teşekkür ederim.

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı yüksek lisanstaki arkadaşlarım Cansu ÖNLEN, Naciye ERYILMAZ, Hayat ASLAN MULLAOĞLU ve Saadet Merve OCAK'a, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm doktor, teknisyen ve personel arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca güzel arkadaşlıklarını esirgemeyen ve onlarla kalıcı dostluklara temel attığımız inandığımız Enfeksiyon Hastalıkları, Dermatoloji ve Göğüs Hastalıkları'ndaki doktor arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, onur ve gurur duyduğum canım annem ve babam Emel-Edip PAŞA'ya, canım kardeşlerim Onur-Seçil-Seval PAŞA'ya ve tez çalışmalarım boyunca tüm kahrımı çeken sevgili nişanlım Aylin DİBEK'e çok teşekkür ederim.

Dr. Özgür PAŞA

HATAY-2013

VII. ÖZET

Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu, metallo ve AmpC tipi beta laktamaz varlığının araştırılması, AmpC tipi beta laktamaz üretiminin genotipik olarak saptanması

Giriş ve Amaç: Antimikrobiyal ilaçlara karşı zamanla gelişen direnç infeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirmekte ve önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde GSBL, MBL ve AmpC tipi beta laktamaz varlığının araştırılması, AmpC geninin PZR yöntemiyle saptanması amaçlandı.

Materyal ve Yöntem: Çalışmaya 100 *P.aeruginosa* kökeni dahil edildi. Tüm kökenlerin antimikrobiyal duyarlılıkları Vitek 2 otomatize sistemi ile belirlendi. *P.aeruginosa* kökenlerinde GSBL varlığı kombine disk doğrulama testi ile MBL varlığı E-test yöntemi ile AmpC tipi beta laktamaz varlığı disk indüksiyon testi ile araştırıldı. AmpC tipi beta laktamaz üretiminin genotipik olarak saptanması için PZR yöntemi kullanıldı.

Bulgular: En çok örneğin geldiği klinik %30 ile Yoğun Bakım Üniteleri olarak tespit edildi. Çalışılan kökenlerin en duyarlı olduğu antibiyotiklerin imipenem amikasin, meropenem olduğu saptandı. Piperasilin/tazobaktam, sefepim, levofloksasin, seftazidim ise en dirençli oldukları antibiyotiklerdi. Kökenlerin sadece birinde (%1)'inde MBL pozitif olarak bulundu. Kökenlerin %4'ü GSBL pozitif olarak belirlendi. Disk indüksiyon testi ile örneklerin %73'ünde AmpC tipi beta laktamaz pozitif olarak bulundu. Bunların %8'i konstitütif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif örneklerdi. Çalışılan örneklerin %96'sında PZR yöntemiyle *AmpC* geni tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışmada bulunan GSBL ve MBL oranları yapılan diğer çalışmalara göre daha düşük bulunurken AmpC beta laktamaz oranı yüksek bulunmuştur. Bazı kökenlerde (%23) *AmpC* geni saptanmasına rağmen disk indüksiyon testi ile AmpC beta laktamaz üretmediği saptanmıştır.

Beta laktamazların ve bu beta laktamazları kodlayan genleri taşıyan kökenlerin saptanması infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, infeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve infeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, direnç, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz, metallo beta laktamaz, AmpC beta laktamaz, *AmpC* geni.

VIII. ABSTRACT

Determination of the presence of extended spectrum, metallo, AmpC beta lactamase enzymes and genotypic detection of AmpC type beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples

Background and Aim: Antimicrobial resistance developed over time, complicates the treatment of infectious diseases and this condition emerges as the problem. In this study in *Pseudomonas aeruginosa* strains which were isolated from clinical samples, the production of ESBL, MBL and AmpC beta lactamase enzymes were aimed to be investigated. And also *AmpC* gene was aimed to be detected by PCR method.

Methods: A hundred *P.aeruginosa* strains were included in the study. Antimicrobial susceptibilities of all the strains were determined by Vitek 2 automated system. The presence of ESBL was investigated by combined disk confirmation test, the presence of MBL was investigated by E-test method and the presence of AmpC beta lactamase was investigated by disk induction test. In order to detect the production of AmpC type beta lactamase genotypically, the PCR method was used.

Results: The clinic from which the most frequently samples (30%) were sent was determined as intensive care units. The strains were mostly susceptible to amikacin, meropenem. The highest resistance rates were found against to piperacillin/tazobactam, cefepime, levofloxacin, ceftazidime. Only one strain was found to be MBL positive. 4% of strains were found to be ESBL positive. AmpC type beta lactamase production was positive in 73% of the strains via disk induction test. Eight percent of them were constitutive (uninductible-stable dereprese mutant) AmpC type beta lactamase positive. *AmpC* gene was detected in 96% of the studied strains by PCR method.

Conclusion: While ESBL and MBL rates in this study were significantly lower than the rates found in other studies, the rate of AmpC beta lactamase was higher. Although *AmpC* gene was detected in some strains (23%), they were found not to produce AmpC beta lactamase by disk induction test.

Detection of beta lactamases and the strains carrying beta lactamases encoding genes will be guide for selection of antibiotics used in the treatment of infectious diseases, following the treatment of infectious diseases and the development of prevention and infection control programs.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, extended spectrum beta lactamase, metallo beta lactamase, AmpC beta lactamase, *AmpC* gene.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Penisilinin keşfinden günümüze kadar çok sayıda yeni antimikrobiyal ilaçlar geliştirilmiş ve infeksiyon hastalıklarına karşı tedavide kullanılmıştır. Antimikrobiyal ilaçlara karşı zamanla gelişen direnç infeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirmekte ve önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu son yıllarda tüm dünyayı tehdit etmeye başlamıştır (1).

Pseudomonas aeruginosa kökenleri ciddi infeksiyonlara ve hastane infeksiyonlarına yol açmaktadır. *P.aeruginosa* birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir. Ayrıca mutasyonlar sonucunda çok sayıda antibiyotiğe dirençli izolatlar ortaya çıkmaktadır. Bu da *P.aeruginosa* kökenlerinin hastane infeksiyonlarında en önemli bakterilerden biri olmasına yol açmıştır. Seftazidim, siprofloksasin, gentamisin ve imipenemden en az üçüne dirençli *P.aeruginosa* kökenleri çoğul ilaca dirençli (multi drug resistant-MDR) *P.aeruginosa*'lardır. Çoklu ilaç direnci özellikle hastane infeksiyonlarında sorun oluşturmaktadır (2).

Beta laktamaz üretimi birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Beta laktamazlar, beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getirirler. Günümüze kadar tanımlanan 340 farklı beta laktamaz enziminin yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL)'lardır (3,4). GSBL'ler penisilinler, 1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize ederler. Ancak karbapenemler, sefamisinler ve beta laktamaz inhibitörleri GSBL'lerin hidroliz etkisine dayanıklıdır (5,6). GSBL üreten kökenlerle infeksiyon riski bazı faktörlerle artmaktadır. Bunlar uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu

beta laktam antibiyotik kullanımınıdır (7). GSBL üreten kökenlerin hastane infeksiyonu etkeni olarak sıklıkları artmaktadır ve bunlar genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından bunlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır (8,9). Bu enzimleri sentezleyen genlerin plazmidler üzerinde bulunması direncin hızla yayılımına neden olmaktadır (10).

Metallo beta laktamazlar (MBL) birçok beta laktam antibiyotiği hidrolize eder ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı değildir. Bu yüzden kazanılmış MBL genleri taşıyan bakteriyel patojenler beta laktamlara karşı geniş spektrumlu direnç gösterir. Bu enzimlerin etkili karbapenemaz aktiviteleri dolayısıyla MBL üreten bakterilerin direnç profili en geniş spektrumlu ve Gram negatif hastane infeksiyonlarının tedavisinde son çare ilaçlar olan karbapenemleri de içerir. Ayrıca MBL genleri çoğul direnç integronlarındaki diğer ilaç direnç genleri ile birlikte bulunabildikleri için MBL üreten bakteriler ek olarak bazı ilaçlara da direnç fenotipi sergilerler (3,11,12).

P.aeruginosa, birkaç *Enterobacteriaceae* üyesinde bulunan kromozomal olarak kodlanmış AmpC beta laktamaz benzeri indüklenebilir AmpC sefalosporinaz taşır. *P.aeruginosa* suşları genellikle düşük düzeyde AmpC beta laktamaz üretirler ve antipsödomonal penisilinlere, penisilin-inhibitör kombinasyonlarına, sefalosporinlere ve karbapenemlere duyarlıdırlar. Bununla birlikte *P.aeruginosa*'da AmpC beta laktamaz üretimi önemli ölçüde arttığı zaman karbapenem dışındaki tüm beta laktamlara karşı direnç gelişir. Hastalarda tedavi sırasında ortaya çıkan *P.aeruginosa* direnci daha büyük bir tehlike oluşturmaktadır. İlk antibiyotik duyarlılık verilerine dayanarak uygun bir beta laktam ile başlanan tedavi AmpC aracılı direnç ortaya çıkması nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (13). Bundan dolayı *P.aeruginosa*'nın yol açtığı hem toplum kökenli hem de hastane infeksiyonlarının tedavisinde ciddi zorluklarla karşılaşılabilir. *P.aeruginosa* infeksiyonlarında beta laktamazların saptanması ve antibiyotik duyarlılıklarının takibi, ampirik tedavide uygun antibiyotik seçimine ve etkin tedavi yaklaşımlarına katkı sağlanması açısından son derece önemlidir.

Bu alışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2011 - Eylül 2012 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden (idrara, yara, bronkoalveolar lavaj, balgam, trakeal aspirat, plevral sıvı, kan) izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinde GSBL, MBL ve AmpC tipi beta laktamaz araştırılması, *AmpC* geninin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alan klinik ve çevresel açıdan dikkate alınması gereken geniş bir cinstir (14). *Pseudomonas* türleri Gram negatif, nonfermentatif, sporsuz, aerop, düz veya hafif kıvrımlı, tek veya çoklu flajellaları ile genellikle hareketli ve doğada çok yaygın bulunan basillerdir. Bu bakteriler toprakta ve suda yaşarlar. Çoğu türler bitki ve hayvanlar için patojen olmalarına rağmen insanlar için genellikle fırsatçı patojendir. Nemli ortamlar başta olmak üzere doğada yaygın olarak bulunurlar (14-16). *P.luteola* ve *P.oryzihabitans* dışındaki çoğu türü oksidaz pozitifdir. Isı gereksinimleri 4-36 °C olup çeşitli besin kaynaklarını kullandıklarından farklı çevresel yerleşim gösterebilirler (14). *Pseudomonas* cinsinde en sık izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Birçok hastanede ilk sırada olmasa da hastane infeksiyonuna sık yol açan bir patojendir. Yüksek ilaç direnci nedeniyle genellikle ağır ve tedavisi zor infeksiyonlara yol açarlar (15).

2.1. Tarihçe

P.aeruginosa, kültürü sırasında oluşturduğu mavi-yeşil renge dayalı olarak tarih boyunca çeşitli adlar almıştır. Sedillot 1850 yılında cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olduğunu ilk gözlemleyen kişidir. Mavi renklenmeye neden olan pigment 1860 yılında Fordos tarafından tanımlanmış ve 1862 yılında Lucke bu pigmenti çubuk şekilli organizmalar ile ilişkilendirmiştir (13). Carle Gessard'ın "iki hastanın mavi-yeşil irinli cilt yaralarındaki organizmaların çoğalması" isimli yayınında bildirilene kadar,

P.aeruginosa başarıyla saf olarak izole edilememiştir. Ancak bu organizma, Gessard'ın çalışmaları ile 1882'de saf kültür halinde izole edilmiştir (17). *P.aeruginosa* 1889-1894 yılları arasında mavi-yeşil irin etkeni olarak tanımlanmıştır (13). Akut ya da kronik bir infeksiyona yol açan *P.aeruginosa*'nın invazyon ve yayılma yolları ile ilgili ayrıntılar, Freeman tarafından 1916 yılındaki bir makalesinde yayınlanmıştır (18).

P.aeruginosa, tarih boyunca *Bacterium aeruginosum*, *Bacterium aerugineum*, *Micrococcus pyocianus*, *Bacillus aeruginosus*, *Bacillus pyocianus*, *Pseudomonas pyocianea*, *Bacterium pyocianum*, *Pseudomonas polycolor* gibi isimlerle anılmıştır (16).

2.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Sporsuz, düz veya hafif kıvrık, 0.5-0.8 µm eninde, 1.5-3.0 µm boyunda bazen çift çift ve bazen de kısa zincirler halinde görülen kapsülsüz, kolay boyanan Gram negatif basil ya da kokobasillerdir. *P.aeruginosa*'da çoğu *Pseudomonas*'lardan farklı olarak bir uçta tek kirpik bulunur ve hareketlidir (15,16).

2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Rutin besiyerlerinde kolayca ürerler ve izolasyonları kolaydır. En iyi 37 °C'de ürerler ve zorunlu aeroblardır. Kanlı agarda beta hemolitikdir ve MacConkey agarda piyosyanin pigmentine bağlı olarak tipik yeşil-mavi koloniler oluşturur. İzolasyonları için inkübasyon süresi 24-48 saattir. Ayrıca kirpik proteinleri düşük ısılarda daha iyi sentez edildiğinden hareket besiyerleri oda ısısında inkübe edilmelidir. *P.aeruginosa* nonfermentatiftir. Maltoza etki etmezken, glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterir. L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilazı negatif iken oksidaz, sitrat ve L-arginin dihidrolazı pozitifdir. Triple sugar iron (TSİ) agarda hidrojen sülfür (H₂S) yapmaz (15).

P.aeruginosa basilleri temelde iki çeşit pigment yaparlar. Yeşil-sarı renkte piyoverdin ve mavi renkte piyosyanin adı verilen floresan pigmentler oluştururlar. Klinik izolatların çoğu piyosyanin yapar. Bu pigmentten ötürü “aeruginosa” adı verilmiştir. Depolanan kültürlerde bu özelliklerini kaybedebilirler. Bu pigmentler

Wood lambası ile floresan verirler. Piyosiyanın sadece *P.aeruginosa* tarafından meydana getirilirken fluorescein ise diğeri bir grup *Pseudomonas* türleri tarafından da oluşturulur (15-16). Pyoverdinin kloroformda erimez, sadece suda erir. Bu özelliği ile piyosiyanın diğerlerinden ayrılır (16). Piyosiyanın varlığı *P.aeruginosa* için özgün, ayırıcı bir özelliktir. Kültürdeki 2-aminoasetofenona ait tatlı üzüm benzeri koku özelliği de *P.aeruginosa*'yı tanımlamada ve doğrulamada aynı derecede özgün bir özelliktir (15). Bazı suşlar ayrıca koyu kırmızı renkte piyorubin veya kahverengi siyah piyomelanin pigmentleri yaparlar (15,16).

2.4. Virulans ve Patojenite Özellikleri

P.aeruginosa fırsatçı bir patojendir. Çeşitli yapıları ve hücre dışı enzimleri hastalık oluşmasında yardımcı olmaktadır. *P.aeruginosa*'nın protein adezinleri, piluslar ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları (nonpilus adezinler) olmak üzere iki çeşittir. Bu yapılar epitellere tutunmadan sorumludur. *P.aeruginosa*, pilusları ile öncelikle sialik asitsiz gangliosid reseptörlere tutunur. *P.aeruginosa* suşları aynı zamanda gangliosidlerdeki sialik asit kalıntılarını kaldıran nöraminidaz üretir ve oluşan bu nöraminidaz ile pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşturulmuş olur. Piluslar epitel hücrelere tutunmayı sağlarken musine tutunmaz. Nonpilus adezinlerin bir bölümü hem epitele hem de musine tutunmayı, geri kalan bölümü ise yalnızca musine tutunmayı sağlar. *P.aeruginosa* suşları, bazı koşullarda, polisakkarid kapsül yapar. Hücre dışında bulunan bu yapı slime tabakası, glikokaliks veya mukoid ekzopolisakkarid olarak tanımlanır. Bu yapı bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenerek onu iyice tesbit eder ve onu mukosilyer aktivite, fagositik hücreler, antikolar ve kompleman gibi konak savunmasından korur (15). *P.aeruginosa*'nın oluşturduğu proteaz niteliğindeki enzimleri; koagüle serumu, kazeini, fibrini, jelatini, hemoglobini ve elastini eritir. Bu enzimler kollagenaz, elastaz, jelatinaz ve hemolitik etki gösteren maddelerdir (16). Bunlar deride, akciğerde ve korneada nekrozlar yaparak virulansla direkt ilişki içinde olurlar.

Sitotoksin çoğu ökaryotik hücreye toksik bir proteindir. Lökositlere de sitopatik etki gösterdiğinden lökositin olarak da adlandırılır. Hücre membranlarına etki eder, polimorfonükleer lökositlerin fonksiyonunu bozar ve akciğerlerde damarların hasarına neden olur (15).

P. aeruginosa biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipid olmak üzere iki çeşit hemolizin yapar. Bunlar sinerjik etkiyle lipidleri ve lesitini hasara uğratar. Hemolizinlerde proteazlar gibi nekroz yaparak, infeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardım eder (15).

Lipit A *Pseudomonas* endotoksinidir ve diğerk bakteriyel lipopolisakkaritler gibi organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ancak diğerk Gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerinden biyolojik olarak daha zayıf gibi görünmektedir (15).

Ekzotoksin A (ExoA) 613 aminoasitten oluşan tek bir polipeptit zinciridir ve *P.aeruginosa* suşlarının çoğru tarafından yapılan, ısıya dayanıksız, formalin ile bekletildiğinde toksoid haline dönüşen, özgül antitoksik serumu ile nötralize olan tipik bir ekzotoksindir (15-16). Bu toksin adenozin difosfatın transferini katalize ederek elongasyon faktörü 2 (EF2)'yi inaktive eder ve dolayısıyla protein sentezini inhibe eder. Ayrıca lokal doku hasarında ve bakteriyel invazyonda rolü vardır (15).

Ekzoenzim S (ExoS) de hücre dışı enzimdir. ExoA gibi adenozin difosfat ribozil transferazdır. Ancak hedef proteini henüz tanımlanmamıştır. ExoS salgılayamayan mutant suşlar, deneysel yanık ve kronik akciğerk infeksiyonlarında daha az virülandır (15). *P.aeruginosa*'nın virulans faktörleri, rolleri ve kontrolü Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *P.aeruginosa*'nın virulans faktörleri, rolleri ve kontrolü (15)

Virulans Faktörü	Rolü	Kontrolü
Piluslar ve Nonpilus adezinler	Akciğerlere ve yara bölgesine yerleşme	Nitrojen düzeyi
Nöraminidaz	Piluslarla yapışmayı kolaylaştırır.	Osmolarite
Ekzoenzim S	Olasılıkla konak hücre G proteinlerini etkiler ve fagositozu engeller.	Isı, oksijen düzeyi
Ekzotoksin A	Difteri toksini gibi EF2'yi etkileyerek doku hasarı yapar, fagositozu engeller.	Demir
Elastaz	Damarlar ve akciğerleri hasarlandırır. İmmun kompleks depolanmasından sorumludur.	Bakteri yoğunluğu
Alginat sentezi (Slime tabakası)	Tutunma ve fagositozun engellenmesi,bazı antibiyotiklere direnç	Osmolarite ve Nitrojen düzeyi
Lipopolisakkarid	Septik şok, bazı antibiyotiklere direnç	Bilinmiyor
Antibiyotik direnci	Tedavinin etkinliğini bozar	Bilinmiyor

2.5. Dirençlilik

Pseudomonas 'lar ısıya dirençsizdirler. 55 °C'de 1 saat ve 60 °C'de 15 dakikada ölürler (16). Çevre ısısı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Vejetatif bakteriler içinde, çevre koşullarına kendini en iyi uydurabilenlerden birisi de *P.aeruginosa* 'dır. Yeterince nemli ortamda çok az besin maddesiyle, uzun süre canlı kalabilir. *P.aeruginosa* 'lar özellikle hastanelerde daha kolay barınma ortamı bulurlar. Hastanede solunum cihazları, duşlar, banyolar, fosekler, soğuk su nemlendiricileri, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler, tamponlar, yerler gibi çok sayıda alandan izole edilebilir. Birçok dezenfektana karşı oldukça dirençlidir ve dörtlü amonyum bileşikleri, heksaklorofenli sabunlar ve iyotlu solusyonlar içinde bile üreyebilir. Fenoller ve beta glutraldehitler *Pseudomonas* 'ların dezenfeksiyonunda etkili olabilir (15,16). Özellikle penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinler olmak üzere sıklıkla kullanılan çoğu antibiyotikler, *Pseudomonas* 'lara etkili değildir (15). *Pseudomonas* 'lar ürettikleri beta laktamaz enziminin aktivitesine bağlı olarak yüksek derecede dirençlilik gösterirler. Antibiyotikler arasında kolistin, karbenisilin, azlosilin, mezlosilin, tikarsilin, piperasilin ve gentamisin dışındakilere değişik derecelerde dirençlilik gösterirler (16).

2.6. Antijenik Yapı

Lipopolisakkarit yapısındaki somatik (O) antijenleri *P.aeruginosa* 'nın çeşitli suşlarını epidemiyolojik amaçlar için gruplara ayırmada kullanılır. İki yaygın serotiplendirme şeması vardır. Birisi Fisher-Devlin-Gnabasik sistemidir ve 7 tipi vardır. Diğer uluslararası antijen tiplendirme sistemi (IATS)'dir ve toplam 17 farklı tip gösterir (15).

2.7. Plazmidleri, Fajları, Bakteriyosinleri

Pseudomonas 'larda bir yandan metabolizma ile ilgili olaylarda rol alan, diğer yandan da çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmalarında rol oynayan çok sayıda plazmid bulunmaktadır. *Pseudomonas* 'lar çoklu ilaç dirençlidirler. Bunun sebebi olasılıkla enterik bakterilerden ve diğer *Pseudomonas* suşlarından kazanılan direnç plazmidleri ile oluşan dirençtir. *Pseudomonas* 'larda gen transferleri konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyonla olmaktadır (15). Çoğu *Pseudomonas* suşu en az

bir profaj için lizojendir. Faj tiplendirmeleri için değişik sayıdaki faj setleri kullanılmaktadır. Enterobakterilerde bakteriyosin yapımını sağlayan genler plazmidlerde yer alırken, *Pseudomonas*'larda kromozoma yerleşmiştir. *Pseudomonas*'ların çeşitli suşlarınca oluşturulan bakteriyosinlere piyosin ve aeruginosin de denir. *P.aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosin tipi belirlenmiştir (15).

2.8. Patogenez

P.aeruginosa sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa neden olur. Birçok olguda hastalık normal konak savunmasının bozulmasıyla başlar. Bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar *Pseudomonas* infeksiyonlarına zemin hazırlar. Nötropeni, hipogamaglobulinemi, kompleman eksikliği buna örnektir. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulması, damar içi veya üriner katater varlığı, endotrakeal tüp kullanımı hastalık gelişmesini kolaylaştırır. Ayrıca *P.aeruginosa*'nın farklı çevre şartlarına uyum sağlayabilmesi, beslenme gereksinimlerinin azlığı ve antibiyotiklere kolay direnç kazanabilmesi patojenliğine katkıda bulunur. *P.aeruginosa* hem invaziv hem de toksinojeniktir (15).

P.aeruginosa infeksiyonları sırasıyla üç aşamada gerçekleşir (15):

1. Bakteriyel tutunma ve kolonizasyon
2. Lokal yerleşme
3. Sistemik yayılım ve sistemik hastalık.

2.9. Yaptığı Hastalıklar

P.aeruginosa fırsatçı bir patojendir ve insanlarda birçok infeksiyona neden olmaktadır. Son yıllarda hastane ortamında bu infeksiyonlar gittikçe artmıştır. Bakterilerin bu ortamda çok kolay barınmakta olduğu ve dirençli suşların bir hayli arttığı gözlenmektedir (15,16).

Pseudomonas infeksiyonlarının meydana gelebilmeleri için bakterilere ait ve virulansla ilgili faktörler dışında insanlara ait faktörleri başlıca şu şekilde toplamak mümkündür (16):

a) Vücudun infeksiyonlara karşı direncinin kırılmış olması: Ağır hastalıklar, yaşlılık, anti metabolit ve immunosupressif ilaçların kullanımı bu sonuca vardır en önemli etmenlerdir.

b) Yenidoğan ve özellikle prematüre çocukların *Pseudomonas* infeksiyonlarına karşı açık bir duyarlılıkları vardır.

c) Sağlam ve direnci yerinde bulunan vücutta bakterilerin çeşitli yollardan savunma mekanizmasını atlayarak doku içine sokulmaları: Özellikle tıbbi girişimler bu yönde önem taşırlar. Yanık yaraları bu konuda en önemli giriş ve yerleşme zeminini oluştururlar.

Pseudomonas infeksiyonlarının son 20 yıl içinde hastane ortamında gittikçe arttığı açıkça gözlenmektedir. Hastane ortamında *Pseudomonas* infeksiyonlarına yol açan koşullar şu şekilde özetlenebilir (16):

1-Hastanede kullanılan enjektabl kontamine sıvıların damara, dokuya, intratekal yola verilmeleri, yıkama sıvılarının yaralara ve idrar kesesine uygulanmaları, aerosol halinde solunum yoluna verilmeleri hastanedeki *Pseudomonas* infeksiyonlarının birçoğunda rol oynar. Yenidoğan ve özellikle prematüre çocukların derilerine sürülen losyonlar ve benzeri uygulamalar da infeksiyon kaynağıdır.

2-Yanık, yoğun bakım ve üroloji servislerinde duyarlı kimselere yerleşerek infeksiyon yapan *P.aeruginosa* bakterileri bakıcıların elleri veya ortak kullanılan aygıtlar aracılığı ile hastadan hastaya bulaşarak küçük çapta salgınlara neden olurlar.

3-Hastanelerde bir süre kalan kimselerin bağırsak florasında *Pseudomonas* 'ların arttığı ve hatta aynı grup bakterilerin yer aldığı görülmekte olup bu bakterilerin hastalarda kendi yaralarına bulaşmak yolu ile otoinfeksiyona yol açtıkları bilinmektedir.

P.aeruginosa 'nın yol açtığı önemli infeksiyonlar şunlardır:

1. Endokardit: Özellikle intravenöz ilaç kullananların kalp kapaklarında infektif endokardite neden olur (15).

2. Solunum Sistemi İnfeksiyonları: Daha çok entübasyon, bronkoskopi vb. girişimlerden sonra görülür (16). *P.aeruginosa* ile alt solunum yolu infeksiyonları daha çok immunsuprese hastalarda görülür. Kistik fibrozisli hastalarda akciğerlerde kronik *Pseudomonas* infeksiyonları görülür. Çünkü bu hastalarda anormal solunum yolları sekresyonu mevcuttur Ayrıca opsonizasyon, fagositoz ve bakterisit mekanizmaları etkili değildir (15).

3. Bakteriyemi: Mortalite oranı kanserlilerde % 33-38 arasında olmak üzere değişkendir. Solunum, gastrointestinal ve üriner sistem, deri ve yumuşak dokular, damar ve çevresi odakları primer infeksiyon bölgeleridir (15,16).

4. Merkezi Sinir Sistemi İnfeksiyonları: Daha çok lomber ponksiyon ya da lomber anestezi sırasında kontamine iğne veya solüsyonlarla etkenin beyin-omurilik sıvısına bulaştırılması ile görülür. Septisemi esnasında da kan yolu ile yayılım sonrası menenjitler görülebilir (16). *P.aeruginosa*, kanserlilerde menenjit ve beyin abselerinde ikinci sıklıkta görülen bir etkindir (15).

5. Kulak İnfeksiyonları: *P.aeruginosa* sağlıklı insanlarda çok nadir görülmekle birlikte sıklıkla yüzücülerde dış kulak yolu infeksiyonuna yol açar. Diyabetiklerde bu infeksiyon yaygın ve ağır seyredebilir (15,16). Ayrıca orta kulak infeksiyonu veya dış kulak yolu infeksiyonlarından sonra mastoidit gelişebilir. Bu hastaların çoğunda diabetes mellitus veya bağışıklık sistemini etkileyen başka bir hastalık vardır (15).

6. Göz İnfeksiyonları: *P.aeruginosa*, bakteriyel kornea ülseri, keratit ve endoftalmite sık neden olan etkenlerdendir. Körlüğe varan, gözün kaybı ile sonuçlanabilen infeksiyonlara yol açabilir (15,16).

7. Kemik ve Eklem İnfeksiyonları

8. Üriner İnfeksiyonlar: Genellikle hastanede kazanılır. Üriner kataterizasyon, tıbbi girişimler, sistoskop, cerrahi ve böbrek transplantasyonu ile ilişkilidir (15,16). Sistit ve bakterilerin yukarı yollara ulaşmaları ile piyelit, piyelonefrit tipinde hastalıklar şeklinde görülür (16).

9. Gastrointestinal İnfeksiyonlar: *P.aeruginosa* çocuklarda orta şiddette diyare yapabilir. Bebeklerde daha ağır tablolara, nekrozlu öldürücü enterokolite neden olabilir (15).

10. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları: *Pseudomonas* bakteriyemisi sırasında tipik olarak ektima gangrenosum denilen deri lezyonları gelişebilir. Ayrıca bakteriyemi sırasında derialtı nodülleri, derin abseler, sellülit, veziküler veya püstüler lezyonlar, büller görülebilir. *Pseudomonas*'a bağlı deri infeksiyonları lokal veya yaygın olabilir. Yanık, travma, dekubit ülserleri ve dermatitler yatkınlık yaratan durumlardır (15). Çeşitli yollarla bulaşan bakteriler çoğu kez mavi renkte irinle seyreden, yara ve yanıklarda lokal infeksiyonlara neden olurlar. Yanıklarda tedavi amacı ile konulan greftlerin atılmasına yol açar. Geniş yanıklarda ve yaralarda bakteriler kana geçerek yayılabilir ve sepsise yol açabilir (16).

2.10. Laboratuvar Tanısı

İnfeksiyon tipine göre sürüntü, pü, idrar, kan, beyin-omurilik sıvısı, balgam gibi klinik örnekler alınmalıdır (15,16).

Gram boyalı preparatlarda, Gram negatif basiller görülür. Örnekler kanlı agar ile MacConkey veya Eosin Methylene Blue (EMB) agara yapılmalıdır. Kanlı agarda beta hemolitik kolonilerin üremesi, MacConkey agarda (veya EMB'de) laktoz negatif kolonilerin üremesi, tipik meyve kokusu oluşması ve üreme ortamını boyayan mavi-yeşil pigmentin olması *Pseudomonas*'ı düşündüren tipik özelliklerdir (15).

Ayrıca oksidaz, katalaz gibi biyokimyasal özellikleri belirlenmelidir. Ticari kitler ve otomatize aletler kullanılarak da *Pseudomonas*'ların özellikleri araştırılabilir (15). Özellikle hastanede *Pseudomonas* salgını varsa değişik hastalardan ve hastane ortamından üretilen *Pseudomonas* suşları birbiriyle karşılaştırılmalıdır. Bunun için antibiyotik duyarlılık modelleri incelenmeli, serotiplendirme, faj ve piyosin

tiplendirmeleri yapılmalı ve plazmidleri incelenmelidir. Böylece hastane infeksiyonunun kaynağı bulunabilir ve gerçek bir salgının varlığı anlaşılabilir (15,16).

2.11. Tedavi

Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere çoklu direnç göstermeleri nedeniyle bu infeksiyonların tedavisi zordur. Çoğu *Pseudomonas* suşları ilk izolasyonda amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler ile azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin ve tikarsilin gibi geniş spektrumlu penisilinlere duyarlıdır. Penisilinlere karşı direnç gelişimini önlemek için penisilin ile birlikte aminoglikozid verilmelidir. Ayrıca seftazidim ve sefoperazon gibi üçüncü kuşak sefalosporinler, yeni antibiyotiklerden kinolonlar ve karbapenemler *Pseudomonas*'lara oldukça etkilidir. Antibiyotik tedavisi yanında infeksiyonun yerine, tipine göre infekte kalp kapaklarının ve vejetasyonlarının çıkarılması, plevral sıvının boşaltılması, absenin drenajı, yaranın debridmanı gibi cerrahi girişimler gereklidir (15).

2.12. Korunma ve Kontrol

Hastanede hastaların *Pseudomonas* kolonizasyonunu önlemek için hastane ortamının temiz ve kuru olması sağlanmalıdır. Zemin, yatak, çarşaf, eşya ve bakıcıların el temizliğine, sonda, kateter, çeşitli entübasyon ve endoskopi aletlerinin sterilizasyonu ve temizliğine kesinlikle uymak gereklidir (15,16). Ayrıca kistik fibrozisli hastalarda, ağır yanıklı hastalarda ve çocuklarda *Pseudomonas* infeksiyonlarının ölüm oranını azaltmak için *P.aeruginosa*'nın hücre duvarından hazırlanmış en az iki ticari aşısı vardır. Çok ağır hastalarda denenebilir (15).

2.13. *P.aeruginosa*'da Antimikrobiyal Direnç

Düşük dış membran permeabilitesi, çeşitli dışa atım pompalarının ekspresyonu sebebiyle *P.aeruginosa*, yapısal olarak farklı birçok antibiyotiğe intrensek olarak dirençlidir. Penisilin G, aminopenisilinler (beta laktam inhibitörleri ile kombine olanlar dahil), 1. ve 2. kuşak sefalosporinler doğal olarak dirençli olduğu beta laktamlardır. *P.aeruginosa* tedavide ciddi problemlere yol açabilen ek direnç mekanizmalarını kolaylıkla kazanabilir. Duyarlı *P.aeruginosa*, karboksipenisilinler

(karbenisilin, tikarsilin), üreidopenisilinler (azlosilin, piperasilin), bazı 3. kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefsulodin, sefoperazon), tüm 4. kuşak sefalosporinler, aztreonam, imipenem ve meropenem duyarlıdır (19).

Birçok temel direnç fenotipi vardır (19):

1. İntrensek karbenisilin direnci diye adlandırılan fenotip; imipenem hariç meropenem dahil beta laktamların birçoğu için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin 4-8 kat artması ile karakterize fenotiptir. Bu fenotip kinolonlar, trimetoprim, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi beta laktam olmayan antibiyotiklere direnç gösterir. MİK'teki yükselmenin sebebi düşük dış membran permeabilitesi ve efluks sisteminin derepresyonu veya aktivasyonudur.
2. İkinci fenotip; sefemler (sefepim, sefpirom) ve karbapenem dışındaki tüm beta laktamlara direnç gösterir. Antibiyotik bağımlıdır ve AmpC derepresyonu sebep olur (20).
3. Üçüncü fenotip; penisilinlere (tikarsilin, azlosilin, piperasilin) karşı direnç sefalosporinlere karşı dirençten daha fazla etkilenir. Bunun sebebi OXA tip beta laktamazların üretimidir (21). Bu dar spektrumlu oksasilinazlar; geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonam ve moksalaktamlara karşı dirençten ziyade üreidopenisilinler ve karboksipenisilinlere karşı direnci belirler (22).
4. Dördüncü fenotip; karbapenemlere karşı artmış MİK ile karakterizedir. Diğer beta laktamlara karşı direnci etkilemez. Bu fenotipteki suşlar karbapeneme spesifik porin OprD düzeylerini düşürürler (23).
5. Diğer direnç fenotiplerini farklı moleküler sınıflardaki integronda ve plazmidde kodlanmış GSBL'lerin üretimi belirler.

P.aeruginosa'da beta laktam antibiyotiklere direncin enzimatik inaktivasyon, aktif efluks, dış membran permeabilite değişiklikleri ve beta laktamlara düşük affiniteli Penisilin Bağlayan Protein (PBP)'lerin sentezi gibi tüm muhtemel mekanizmalar eş zamanlı veya farklı kombinasyonlarda görülebilir.

2.13.1. Beta Laktamaz Üretimine Bağlı Beta Laktam Direnci

Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en temel ve en önemli direnç mekanizması beta laktamaz üretimidir (24,25). *P.aeruginosa*'da da beta laktam antibiyotiklere karşı kazanılmış direncin başlıca mekanizması enzim üretimidir (19). Beta laktamaz genleri, bakteri kromozomunda veya plazmid, integron, transpozon gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilirler. Beta laktamazlar, Gram pozitif bakterilerde doğrudan dış ortama salınırken Gram negatif bakterilerde periplazmik aralıkta bulunurlar. Bu nedenle Gram negatif bakterilerde beta laktamlara bağlı dirençte en sık ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar rol almaktadır (26). Beta laktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Bu enzimler beta laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağına bozar ve bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Bu bir enzim-penisilloil veya bir enzim-sefalosporil molekülüdür. Reaksiyonu gerçekleştiren üç grup protein vardır:

1. Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler (D-D karboksi peptidazlar)
2. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler (Transpeptidazlar)
3. Beta laktamazlar

Bakteri hücre duvarı sentezinde görevli penisilin bağlayan proteinler ve beta laktamazların çoğu, serin proteazlar üst ailesinde bulunan enzimlerdir. Bu enzimler beta laktamdaki amid bağına yıkarak bir açıl enzim türevi oluşturur. Bu açılasyon reaksiyonunda nükleofil işlevi gören molekül, aktif bölgedeki bir serin molekülüdür. Bu serin molekülü A grubu enzimlerde Ser 70; C grubunda Ser 64'tür. Beta laktamazlarda yine bir aktif bölgede bulunan bir su molekülü hidroliz ile deaçilasyona yol açar. Bu işlemde bir su molekülü açıl-enzim türevindeki ester bağına hidrolize eder. Enzimi penisilloil veya sefalosporil molekülünden ayırır. Beta laktamazlar ve PBP'ler arasındaki başlıca fark sadece deaçilasyon hızıdır. Beta laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılırken PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez ve antibiyotik yerine enzimin inaktivasyonu ile sonlanır (27).

Beta laktamazlar değişik şekillerde adlandırılabilirlerdir. Bunlar (26);

1. Etki ettikleri sustrata göre (örneğin CARP, IMP, OXA)
2. Biyokimyasal özelliklerine göre (örn. SHV sülfidril varyant)
3. Genlerine göre (örn. AmpC, CepA)
4. Direnç fenotipine göre (örn. ARI *Acinetobacter* resistant to imipenem)
5. İzole edildikleri bakterilere göre (örn. PSE, Cfre, AER)
6. Suşlarına göre (örn. P99)
7. Hasta isimlerine göre (örn. TEM, ROB)
8. Hastaneye göre (örn. MIR, RHH)
9. İzole edildikleri bölgeye göre (örn. OHIO, GES)
10. Bulan kişiye göre (örn. HMS)

Beta laktamazlar moleküler yapılarına göre iki geniş gruba ayrılırlar. Bu gruplar; aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunanlar ve çinko atomu bulunanlardır (26). Ambler'in moleküler sınıflamasında ise bu enzimler nükleotid ve aminoasit dizilerine göre dört ayrı sınıfa ayrılır (28):

1. Sınıf A beta laktamazlar: Aktif bölgelerinde bir serin aminoasidi bulunur. Temel substratları penisilinlerdir. Çoğu plazmidlerle taşınırlar.
2. Sınıf B beta laktamazlar: Aktif bölgelerinde çinko bağımlı bir "thiol" grubu bulunur. Metalloenzimlerdirler. Çoğu karbapenemaz aktivitesi gösterirler. Beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler.
3. Sınıf C beta laktamazlar: Aktif bölgelerinde serin aminoasidi taşırlar. Esas olarak sefalosporinaz niteliğindedirler. Kromozomal *AmpC* geni tarafından kodlanırlar ve AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılırlar. *Salmonella* spp. hariç tüm Gram negatif bakterilerde bulunurlar. Bu sınıftaki beta laktamazlar yapı olarak PBP'lere benzerler ve bundan dolayı bunların PBP'lerden köken aldığı düşünülmektedir.
4. Sınıf D beta laktamazlar: Serin proteazdırlar. Oksasilini hızla hidrolize edebilirler.

Bush-Jakoby-Medeiros, 1995 yılında fonksiyonel bir sınıflama yapmış olup 2009'da bu sınıflamayı güncellemişlerdir (29,30). Enzim substratları ve inhibitör profillerine dayanılarak yapılan bu fonksiyonel sınıflamada dört sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. Sınıf A, sınıf C, sınıf D serin temellidir. Sınıf B veya MBL'ler aktivasyonları için çinkoya ihtiyaç duyarlar. *P.aeruginosa*'da sınıf A, B, C, D GSBL'leri içeren dört moleküler sınıf beta laktamaz bulunur (19). Beta laktamaz grupları ve genel özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Beta laktamazların sınıflandırılması (31)

Fonksiyonel Mekanizma	Ambler sınıflandırması	Bush (Gruplar)	Örnekler	Substratlar
Serin beta laktamazlar	Sınıf A penisilinaz	2a, 2b, 2c	Geniş spektrumlu beta laktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzilpenisilin (penisilin), aminopenisilinler (amoksisilin, ampisilin), karboksipenisilinler (karboksipenisilin, tikarsilin), dar spektrumlu sefalosporinler (sefzolin, seforoksim ve diğerleri)
		2be	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazlar (ESBL): TEM ve SHV sınıfı	Geniş spektrumlu beta laktamazların substratları, kloksasilin, metisilin ve oksasilinin substratları
			Diğer: BES-1, GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1/2	TEM ve SHV ailesinin substratları ile aynı
		2br	TEM ailesi (TEM-30, TEM-31) IRT	TEM ve SHV ailesi ile aynı
		2e	CTX ailesi	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, bazı enzimler için sefepim
		2f	Karbapenemazlar: (KPC-1, KPC-2 ve KPC-3; GES-1, GES-2)	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, sefamisinler ve karbapenemler (ertapenem, meropenem, imipenem)
Metallo beta laktamazlar	Sınıf B metallo beta laktamazlar	3a, 3b, 3c	Karbapenemazlar: IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2, GIM-1, ve L1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A'nın substratları ile aynı
Serin beta laktamazlar	Sınıf C sefalosporinazlar	1	AmpC-tip: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, sefamisinler
Serin beta laktamazlar	Sınıf D-kloksasilin hidrolize eden enzimler (OXA)	2d	OXA ailesinin çoğunluğu	Dar spektrumlu grup substratları, kloksasilin, metisilin ve oksasilin
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27 ve OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 'in substratları ile aynı
Bilinmeyen		4	AVS-1	Herhangi bir fonksiyona veya moleküler gruba uymayan karışık veya tanımlanmamış enzimler

2.13.1.1. AmpC Beta Laktamazlar

Ambler sınıflamasına göre moleküler sınıf C, Bush'a göre ilk sınıfta yer alan enzimlerdir (19). AmpC beta laktamaz enzimi, 1940 yılında her ne kadar o zaman isimlendirilmese de bir *E.coli* kökeninde penisilini parçalayan ilk bakteriyel enzim olarak bildirilmiştir (32). İsveçli araştırmacılar, 1965'te *E.coli*'de penisilin direncinin sistematik genetik çalışmalarına başlamışlardır. Mutasyonlarla yavaş yavaş gelişmiş direnç, ampA ve ampB olarak isimlendirilmiştir (33,34). Azalan direnç ile sonuçlanan ampA suşundaki bir mutasyon daha sonra ampC olarak tanımlanmıştır (35). Yıllar boyu birçok farklı amp adlandırma sistemi kullanılmış ancak ampC' nin adlandırması değişmemiştir. *E.coli*'deki *AmpC* gen sekansı 1981'de bildirilmiştir (36). *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı türleri gibi *P.aeruginosa* da indüklenebilir kromozomal AmpC beta laktamaz (sefalosporinaz) üretir (19). *E.coli*'de de bu enzimi kodlayan genler mevcuttur. Ancak promoter bölge aktif olmadığından indüklenme özelliği yoktur (37). AmpC beta laktamazlar, sefalosporinlere daha fazla olmak üzere benzil penisiline de etkilidir. Genellikle klavulanik asit ile inhibe olmazlar ve ACC-1 hariç sefoksitin gibi sefamisinleri de hidrolize ederler (26).

Genellikle düşük düzeyde üretilen enzim sefalosporinlerin büyük bir kısmına ve aminopenisilinlere karşı dirence yol açar (38). Bununla birlikte *P.aeruginosa*'daki kromozomal beta laktamaz üretimi indükleyen beta laktamların (genellikle imipenem) varlığında 100-1000 kat artabilir (39). İndükleyici antibiyotik ortadan kalkar kalkmaz AmpC ekspresyonu ve beta laktamaz salınımı normale döner. İndüksiyon mekanizması düzgün çalışan kökenlerde kromozomal beta laktamazlar kinik açıdan fazla sorun oluşmazlar. Ancak *P.aeruginosa*, *C.freundii*, *E.cloacae*, *M.morganii*, *Enterobacter* spp. ve *Providencia* spp. gibi hastane infeksiyonu etkeni türlerde indüksiyon kontrol mekanizmaları defektif olan ve bu nedenle sürekli yüksek düzeyde enzim üretebilen mutant (dereprese) kökenler tedavide başarısızlığa yol açabilirler. AmpC beta laktamazların sürekli yüksek düzeyde üretilmesi en sık *ampD* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu genlerinde defekt bulunan dereprese mutant kökenler bakteri popülasyonunda normalde 10^{-5} - 10^{-8} arasında bir sıklıkta bulunurlar. İndüklenebilir beta laktamaz (İBL)'lar için zayıf birer indükleyici olan çoğu 2. kuşak sefalosporinler, tüm 3. kuşak sefalosporinler, üreidopenisilinler ve aztreonam, yüksek düzeyde üretilen enzim etkisine karşı son derece duyarlıdırlar.

Bundan dolayı İBL üreten bakterilerle oluşan bir infeksiyonun tedavisinde tek başına kullanıldıklarında, önce duyarlı bakteriler ortadan kalkar. Sonra antibiyotiğin etkisine dirençli doğal mutantlar seçilir ve bunlar çoğalarak tedavinin başarısız olmasına yol açabilirler. Beta laktam ajanlar indükleyici etkilerine ve üretilen beta laktamaza duyarlılıklarına göre dört gruba ayrılır (26):

1. İndükleyici ve dayanıksız olanlar: Aminopenisilinler, birinci kuşak sefalosporinler, sefoksitin, sefotetan, klavulanik asit. Bu antibiyotikler, indükledikleri beta laktamaz tarafından hızla inaktive edilir.

2. İndükleyici ve dayanıklı olanlar: İmipenem. Geçirgenlikte azalma vb. başka bir direnç mekanizması eklenmedikçe etkisini sürdürür.

3. İndükleyici olmayan veya zayıf indükleyici olan ve dayanıklılığı sınırlı olanlar: Üçüncü kuşak sefalosporinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve aztreonam. Bu ajanlar, beraberlerinde kuvvetli indükleyici bir beta laktam olmadığı durumlarda İBL üreten türlere etkilidir.

4. İndükleyici olmayan ve göreceli olarak dayanıklı olanlar: Sefepim ve sefpirom. Bu antibiyotikler İBL üreten türlere etkilidir. Ancak imipenem kadar dayanıklı olmadıklarından sürekli ve çok miktarda enzim üretimi halinde aktiviteleri etkilenir.

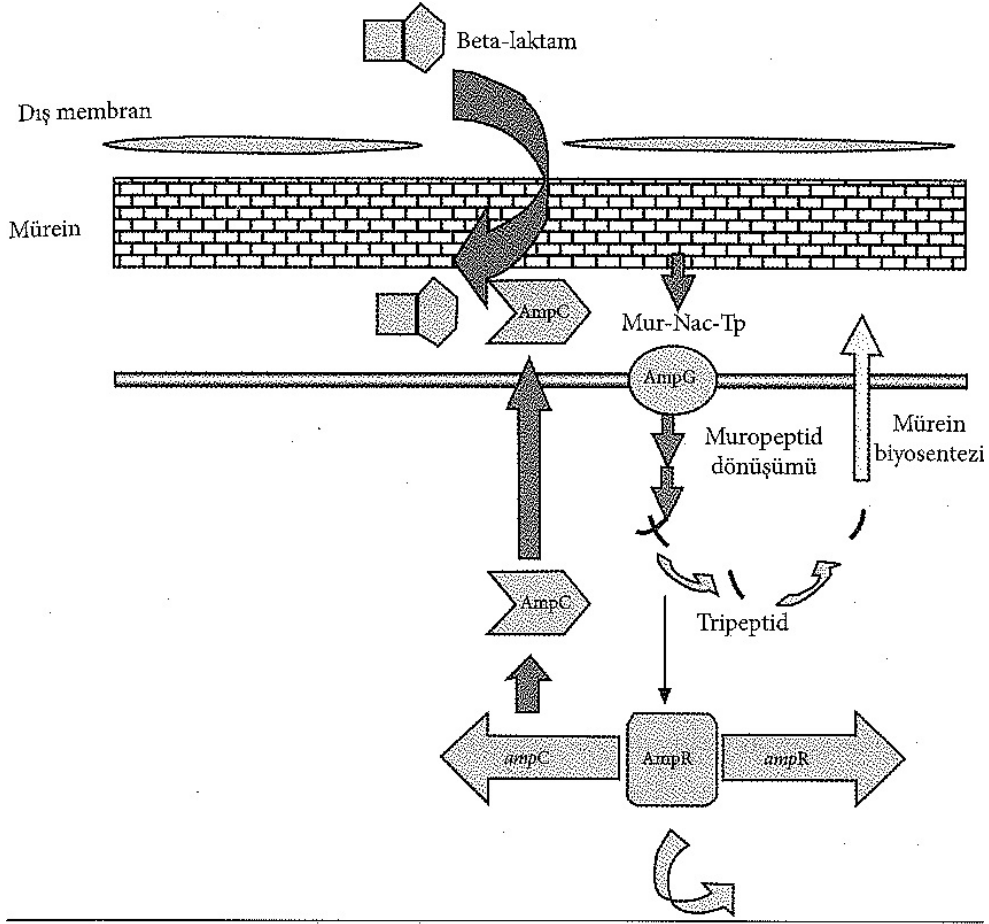
Kromozomal beta laktamaz indüksiyonunun sonucunda, aminopenisilinlere, beta laktamaz inhibitörlerine ve birinci kuşak sefalosporinlere direnç; karboksipenisilinler, üreidopenisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler, aztreonam, sefepim, sefpirom ve karbapenemlere duyarlılık görülür (26).

AmpC beta laktamaz *AmpC* geni tarafından kodlanır. Birçok gen *AmpC* indüksiyonunda görev alır. Görev alan enzimleri kodlayan *AmpR*, *AmpC*'ye komşudur. Fakat ayrı transkribe edilir. LysR ailesi üyesidir ve pozitif transkripsiyonel düzenleyicidir. Bu düzenleyici beta laktamaz indüksiyonu için gereklidir. *AmpR*'nin transkripsiyonel düzenleyici aktivitesi peptidoglikan işleme ile ilgilidir. İkinci gen *AmpG*, *AmpC* indüksiyonunda görev alan tek molekül olduğu düşünülen 1,6-anhidromurapeptid'ler için permeaz gibi görev yapan transmembran proteinini kodlar. Üçüncü gen; AmpC ekspresyonunu baskılayıcı olarak görev yapan

1,6-anhidromurapeptidleri hidrolize eden sitozolik N-asetil-anhidromuramil-L-alanin amidaz kodlayan *AmpD* genidir. Dördüncü gen *AmpE* geni induksiyon için gerekli olan sitoplazmik membran proteinini kodlar. Gram negatif bakterilerde AmpC beta laktamaz induksiyonu için gereken proteinler Tablo 3'te gösterilmiştir. Bazı plazmidde kodlanan sefalosporinazların psödomonal kromozomal AmpC beta laktamazların yapısına benzediği gösterilmesine rağmen *Enterobacteriaceae*'ların aksine *P.aeruginosa*'nın plazmid aracılıklı sefalosporinaz ürettiği gösterilmemiştir (19). Resim 1'de kromozomal AmpC beta laktamaz induksiyon mekanizması gösterilmiştir.

Tablo 3. Gram Negatif Bakterilerde AmpC Beta Laktamaz İndüksiyonu İçin Gereken Proteinler (7)

Protein	Rolü
AmpR	Transkripsiyonun düzenlenmesi
AmpG	İndüksiyon sinyalinin geçirilmesi için gerekli olan integral membran
AmpD	Beta laktamaz ifadesinin “down-regülasyonu”
AmpE	Represyonun artışı; olması şart değil
PBP2	Beta laktamla etkileşime giren protein



Resim 1. Kromozomal AmpC beta laktamaz induksiyon mekanizması (26).

P.aeruginosa kökenlerinde İBL pozitifliği ülkemizde %40-82 oranları arasında, yurtdışında %72-98.5 oranlarında bildirilmiştir (40-46).

Plazmid kökenli AmpC tipi beta laktamazlar ilk kez 1989 yılında tanımlanmış ve MIR-1 olarak isimlendirilmiştir (47). Daha önceleri *AmpC* genlerinin sadece kromozomlar üzerinde bulunduğu düşünülüyordu. Ancak son zamanlarda *AmpC* genleri plazmidler üzerinde de tespit edilmiştir (48). Kromozomal AmpC beta laktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile plazmid kökenli aktarılabılır AmpC tipi beta laktamazlar ortaya çıkmıştır. Plazmid kökenli AmpC tipi beta laktamazlar indüklenememe özelliğine sahiptirler ve sayıları 20'den fazladır (20).

Plazmid kökenli AmpC beta laktamazlar, beta laktam direncinin yayılması, aynı plazmid üzerinde *AmpC* genine ek olarak, başka direnç elemanları da taşınması açısından, indüklenebilir AmpC beta laktamaz üreten türler ise hastane

infeksiyonlarında sık olarak karşımıza çıkması nedeniyle son derece önemlidir. Bu nedenle tedavi seçenekleri iyice kısıtlıdır. İndüklenebilir AmpC beta laktamaz üreten kökenlerle oluşan infeksiyonlarda antibiyogram sonucu üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı olarak bulunsa da tedavi sırasında direnç gelişebilmektedir. AmpC beta laktamazlar, beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidir. *P.aeruginosa* ile oluşan infeksiyonlarda sefepim öncelikle tercih edilebilir. Çünkü sefalosporinler içinde *P.aeruginosa*'ya karşı etkinliği iyi olan ve beta laktamaz indüksiyonu düşük olan bir antibiyotiktir. Karbapenemler alternatif tedavi seçeneğidir. Kombine tedavide ise kinolonlar ve aminoglikozidler kullanılabilir. İndüklenebilir AmpC beta laktamaz üreten türlerle gelişen infeksiyonlarda üçüncü kuşak sefalosporinler veya geniş spektrumlu penisilin türevleri kullanılacaksa tedaviye mutlaka ikinci bir ajan eklenmelidir (26).

2.13.1.2. Sınıf A Karbenisilin Hidrolize Eden Beta Laktamaz

P.aeruginosa'da dört tip karbenisilin hidrolize eden beta laktamaz bulunur; PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4. Bunların substratları karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve sefsulodindir. Bu enzimler moleküler sınıf A ve fonksiyonel grup 2c'ye aittir. Karbenisilinaz üretenler sefepime, sefpiroma, aztreonama karşı değişik derecede duyarlılık gösterir ve seftazidim ile karbenepemlere %100 duyarlıdır. Sınıf A GSBL'ler PSE'lerin aksine moleküler sınıf A ve fonksiyonel sınıf 2b'dedirler. Sadece karboksipenisilin ve üreidopenisilinlere değil, geniş spektrumlu sefalosporinlere (seftazidim, sefepim, sefpirom) ve aztreonama da dirence sebep olurlar. Karbepenemlere düşük affinite gösterirler. Klavulanik asit ve tazobaktam ile in vitro aktiviteleri inhibe olur. Klinik *P.aeruginosa* izolatlarında sınıf A GSBL'lerin bulunması 1990'dan sonraki yıllarda olmuştur. *Enterobacteriaceae* ailesinde iyi bilinen TEM ve SHV tipi enzimlerden farklı olarak *P.aeruginosa*'da diğer enzimler PER (Türkiye'deki klinik izolatlarının birçoğunda), VEB (Güneydoğu Asya, Fransa, Bulgaristan'da), GES/IBC (Fransa, Yunanistan ve Güney Afrika'daki suşlar) ve BEL tipleri olarak tanımlanmıştır (19). Sınıf A GSBL kodlayan genler antibiyotik direnç yayılımında önemli rol oynar, *P.aeruginosa* tarafından oluşturulurlar ve hayatı tehdit eden infeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçimini kısıtlarlar. Bu yayılımda plazmid ve integronlar önemlidir. Transpozonlar üzerindeki bazı genlerin yerleşimi antibiyotik direnç

genlerinin hareketini sağlayabilir ve bu gerçek *P.aeruginosa*'nın kromozomunun üzerinde olduğu gibi plazmidler üzerindeki aynı GSBL kodlayan genlerin eş zamanlı yerleşimini açıklayabilir (19).

2.13.1.3. Sınıf D Beta Laktamazlar (Oksasilinazlar)

OXA tip enzimler moleküler sınıf D ve fonksiyonel grup 2d'ye aittirler. Bu enzimlerden OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu, OXA-11'den sonra gelenler geniş spektrumlu enzimlerdir. OXA-11 ilk olarak Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde yatan bir hastadan izole edilen bir *Pseudomonas* suşunda bulunmuştur (49). Klasik OXA enzimleri (OXA-1, OXA-2, OXA-10) karbenisilinlere ve üreidopenisilinlere karşı direnci belirler (seftazidime değil). OXA-10 VE OXA-1 oksasilinazlar üretildiğinde gelişen tikarsilin ve piperasilin direnci, OXA-2 enzimleri üretiminde gelişen tikarsilin ve piperasilin direncinden daha fazladır. Seftazidim hidrolize eden geniş spektrumlu oksasilinazlar daha fazla klinik öneme sahiptir. Bunların hidroliz spektrumu sefotaksim, sefepim, sefpirom, aztreonam ve moksalaktamı da içerir. OXA-18 dışındakiler beta laktamaz inhibitörleri tarafından suprese edilemez. Geniş spektrumlu oksasilinazlar plazmid veya integrondaki genler tarafından kodlanır. Bunun için yayılımları kolaydır ve Avrupa'daki sınıf D GSBL üreten *P.aeruginosa* izolatlarının prevalansı artmaktadır (19).

2.13.1.4. Sınıf B MBL'ler

P.aeruginosa'da görülen diğer grup GSBL'ler karbapenemazlar veya aktif merkezlerindeki çinko varlığından dolayı MBL olarak bilinen enzimlerdir. Moleküler sınıf B'ye aittirler. Karbapenemaz üretimi karbapenemler dahil bütün beta laktamlara karşı direnci belirler. MBL'lerin substrat profilleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri (sefotaksim, seftazidim, sefepim) ve karbapenemleri (imipenem, meropenem) de kapsayacak şekilde çok geniştir. Sadece aztreonam hidrolitik özelliklerinden etkilenmez. Sınıf B karbapenem hidrolize eden enzimlerin aktivitesi klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe edilemez. Bu enzimler etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ve tiyol-bazlı bileşikler gibi metal şelatörleri tarafından inhibe edilirler (28,30,50,51).

IMP ve VIM enzimleri kazanılmış MBL'lerin en yaygın görülen tipleridir (3,12). IMP enzimleri ilk olarak Japonya'da (52), VIM enzimleri ilk olarak İtalya'da (53)

rapor edilmiştir. SPM enzimi Brezilya'da, GIM ise Almanya'da sınırlı kalmıştır (54). Türkiye'de VIM-5 bir *K.pneumoniae* ve bir *P.aeruginosa* kökeninde saptanmıştır (55,56). İlk kez 2008'de izole edilen NDM-1 yeni tanımlanan bir MBL'dir. Hindistan asıllı İsveçli bir kişi Yeni Delhi'ye seyahati sonrasında üriner sistem infeksiyonu geçirmiştir. NDM-1 bu hastadan izole edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* kökeninde tespit edilmiştir. NDM-1 diğer MBL'ler gibi aztreonam hariç tüm beta laktamları hidrolize eder (57).

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda karbapenem dirençli *P.aeruginosa* kökenlerinde MBL pozitifliği %31.5-72.2 arasında bulunmuştur (58-60). MBL'lerde tedavide en önemli sorun geniş spektrumlu direnç profili sergilemeleridir. MBL pozitif kökenler genellikle beta laktamlara, aminoglikozidlere ve florokinolonlara dirençli, polimiksinlere duyarlıdır. MBL pozitif kökenler ile insan infeksiyonlarının sürveyansı yapılmamıştır ve bu infeksiyonları tedavi etmek için uygun bir tedavi hala bilinmemektedir. Hayvan modeli kullanılarak VIM-2 pozitif *P.aeruginosa* kökeni ile oluşturulan pnömoni infeksiyonunda yüksek dozda aztreonamın bakteriyel yükü azalttığı ve faydalı bir ilaç olabileceği gösterilmiştir. Metalloenzim inhibitörleri in vitro kullanılabilirler, ancak hastaları tedavi etmek için herhangi MBL inhibitörü yoktur. Direnç mekanizmalarına bağlı olarak aminoglikozidler gibi diğer antibiyotiklerin de etkileri sınırlıdır. Aminoglikozidler monoterapide kullanılmamalıdır ve bunların MİK değerlerinin hızlı saptanması aminoglikozid molekülü seçmede yardımcı olabilir. Rifampin, çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa* infeksiyonlarını tedavide ilgi çekici bir ajan olabilir. MBL üreten bakteriler ile kolonizasyonu saptamak öncelikli olmalıdır. Erken saptama bu çoğul ilaca dirençli izolatların yayılmasını önleyecek ve tedavide yardımcı olacaktır (61). Tedavide tek alternatif polimiksinlerin terapötik uygulanması olabilir. Polimiksinler daha önceden düşünüldükleri gibi toksik değildir (62).

Bir hastanede MBL pozitif kökenlerin varlığı bir tedavi sorunu olduğu kadar aynı zamanda infeksiyon kontrol çalışmaları için de önemlidir. Hasta yüksek riskli olarak belirlenmeli ve uygun izolasyon önlemleri alınmalıdır (61).

2.13.2. Aktif Dışa Atıma Bağlı Beta Laktamlara Direnç

Genel olarak klinik *P.aeruginosa* izolatları birçok antibiyotiğe *Enterobacteriaceae*'dan daha az duyarlıdır. Bu doğal direncin esas sebebinin yüksek moleküler ağırlıklı (yaklaşık 50 kDa) proteinlerin varlığına bağlı düşük dış membran geçirgenliği olduğu düşünülmektedir. Bu proteinler (OprM, OprJ, OprN) aktif dışa atım sisteminin komponentleridir. Aktif dışa atım *P.aeruginosa*'daki beta laktam direncinde önemli bir enzimatik olmayan mekanizmadır. Dışa atım bütün stratejik antipsödomonal antibiyotiklere karşı çoğul direncin gelişmesinden de sorumludur. MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN, MexX-MexY-OprM direnç nodül hücresi üst ailesine (resistance-nodulation-cell division-RND) ait 3 komponentli efluks sistemi dışa atıma aracılık eder (19).

Efluks sistemleri ve kullandıkları substratlar Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Efluks sistemleri ve kullandıkları substratlar (19)

Sitoplazmik Membran Pompası	Periplazmik Bağlantı	Dış Membran Kanalı	Substrat
MexB	MexA	OprM	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, novobiosin, imipenem dışındaki beta laktamlar
MexD	MexC	OprJ	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, novobiosin, karbenisilin ve sulbenisilin dışındaki penisilinler, sefepim, sefpirom, meropenem
MexF	MexE	OprN	Florokinolonlar, karbapenemler
MexY	MexX	OprM	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, aminoglikozidler, karbenisilin ve sulbenisilin dışındaki penisilinler, sefepim, sefpirom, meropenem

MexB, MexD, MexF ve MexY sitoplazmik membranda bulunan ve enerji bağımlı pompalar olarak çalışan proteinlerdir. OprM, OprJ, OprN dış membran proteinleridir. MexA, MexC, MexE, MexX periplazmik boşlukta bulunur. MexA-MexB-OprM ve MexX-MexY-OprM efluks sistemleri eş zamanlı olarak hareket ederler ve kazanılmış ile doğal antimikrobiyal direnç mekanizmasıdır. MexC-MexD-OprJ ve MexE-MexF-OprN efluks sistemleri ise sadece kazanılmış dirençte rol alır (19).

2.13.3. Dış Membran Geçirgenliğinin Değişmesine Bağlı Gelişen Beta Laktam Direnci

İmipenem dirençli birçok klinik *P.aeruginosa* izolatında OprD eksiktir. OprD proteinleri temel aminoasitlerin ve beta laktam antibiyotiklerden sadece karbapenemlerin girişini sağlayan spesifik kanalları oluşturur. İmipenemle karşılaştırıldığında meropenem OprD eksikliğinden daha az etkilenir. OprD'nin kaybı sadece kromozomal AmpC beta laktamaz ekspresyonunda karbapenemlere karşı direnci belirler. Bu iki mekanizmanın ilişkili olduğunu gösterir (19).

2.13.4. Hedefteki Değişikliğe Bağlı Gelişen Beta Laktam Direnci

P.aeruginosa'daki beta laktam direncine sebep olan nadir mekanizma hedef bölge olan PBP'lerin modifikasyonudur (19).

2.13.5. Aminoglikozid Direnç Mekanizmaları

Enzim modifikasyonu, azalmış dış membran geçirgenliği, aktif dışa atım ve nadiren hedef modifikasyonu bilinen aminoglikozid direnç mekanizmalarıdır (63).

Aminoglikozid modifiye eden enzimler antibiyotik molekülüne fosfat, adenil veya asetil eklerler. Böylece değiştirilmiş antibiyotiğin bakteri hücreindeki hedefine (30S ribozomal alt ünite) bağlanmasını azaltırlar. Aminoglikozid modifiye eden enzimler plazmidde kodlanır. Aminoglikozid fosforil transferazlar, aminoglikozid adenil transferazlar (nükleotidil transferazlar) ve aminoglikozid asetil transferazlar olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. *P.aeruginosa*'da en sık eksprese edilen enzimler şunlardır: AAC(6')-II (gentamisin, tobramisin, netilmisin direncini belirler), AAC(3)-I (gentamisin direncini belirler), AAC(3)-II (gentamisin, tobramisin, netilmisin direncini belirler), AAC(6')-I (amikasin, tobramisin, netilmisin direncini belirler), ANT(2')-I (gentamisin, tobramisin direncini belirler) (19).

Enzime bağlı olmayan aminoglikozid direnci, tüm aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur ve sıklıkla azalmış aminoglikozid birikimi ile ilgilidir. Bu direnç, azalmış dış membran geçirgenliğine bağlı azalmış geri alım mekanizması sonucu gelişir (19).

Aktif aminoglikozid dışa atımı nispeten nadir direnç mekanizmasıdır. MexY-OprM'e bağlı gelişir. Dış membran proteinlerinden OpmB, OpmG, OpmI da sorumludur (19).

16S rRNA modifikasyonu *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri ve *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram negatif patojenler arasında yeni bulunan bir aminoglikozid mekanizmasıdır. Bu olay yeni tanımlanan 16S rRNA metilaz grubu tarafından gerçekleştirilir. Sorumlu genler genellikle transfer edilebilen plazmidler içeren transpozonlarda bulunur (19).

2.13.6. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları

Hedef enzimlerindeki yapısal değişiklik ve aktif dışa atım *P.aeruginosa*'daki florokinolon direncine yol açan iki temel mekanizmadır. Florokinolonlar için primer hedefin (topoizomeraz II olarak da bilinen DNA giraz) modifikasyonu QRDR (quinolone-resistant-determine-region) motifi içeren gyrA/gyrB genlerinin nokta mutasyonları ile gerçekleşir. Bu mutasyon sonucunda A ve B alt ünitelerinin aminoasit dizisi değişir. Bu da kinolon moleküllerine düşük bağlanma affinitesi gösteren değişmiş topoizomeraz II sentezini sağlar. Sekonder hedefin (topoizomeraz IV) mutasyonu parC ve parE genlerinin nokta mutasyonları sonucunda oluşur (19).

Ayrıca yukarıda bahsedildiği gibi bilinen dört dışa atım pompası sisteminin her biri florokinolon direncine yol açabilir.

Yeni bulunan MexV (membran füzyon proteini)-MexW (RND tip membran proteini)-OprM florokinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, etüdyum bromid ve akriflavin direncinden sorumludur. *P.aeruginosa*'da yüksek düzey florokinolon direnci dışa atım pompa sistemleri ve DNA giraz ile topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerin mutasyonuna bağlıdır.

2.14. Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri

2.14.1. GSBL Tanı Yöntemleri

GSBL üretimi normal duyarlılık testleriyle saptanamayabilir. Etkilenen antibiyotiklere duyarlılığın azalması bir gösterge olabilir. Antibiyogramlarda indikatör antibiyotiklerin tamamı bulunmalıdır. Bir suşun GSBL ürettiği

saptandığında beta laktamaz inhibitör kombinasyonları ve sefamisinler hariç tüm sefalosporinler, penisilinler ve monobaktamlara dirençli olduğu kabul edilir. GSBL üreten suşların bakteri sayısının yüksek olduğu durumlarda direnç düzeyleri artar (inokulum etkisi). Bu durum in vitro testlerde duyarlı görülseler bile beta laktam grubu kullanılmaması gerektiğini açıkça göstermektedir (64-66). GSBL'ler fenotipik ve genotipik olmak üzere iki şekilde saptanabilir. Daha pratik olması bakımından daha çok fenotipik yöntemler kullanılır. Genotipik yöntemler ise daha çok araştırma amacı ile kullanılır. Fenotipik yöntemlerdeki temel prensip GSBL'lerin farklı sefalosporinleri hidroliz etmesidir. Ancak fenotipik yöntemlerle GSBL yapımından sorumlu spesifik enzimin adı konulamaz. Bu testte tarama ve doğrulama olmak üzere iki aşama mevcuttur. Tarama aşamasında sefpodoksim, sefotaksim, seftazidim seftriakson ya da aztreonam karşı direnç araştırılır. Doğrulama aşamasında ise bu antibiyotiklerle klavulanik asit arasında sinerji varlığı saptanmaya çalışılır (24).

2.14.1.1. GSBL Tarama Testleri

2.14.1.1.1. Disk Difüzyon Tarama Testi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), GSBL üretiminin taranmasında disk difüzyon tarama testini önermektedir. Bu amaçla sefpodoksim (10 µg), seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg) ya da seftriakson (30 µg) diskleri kullanılır. Özellikle 10 µg sefpodoksim ile yapılan test daha uygun bir tarama testidir. Sefpodoksim zonu ≤17 mm, seftazidim zonu ≤22 mm, aztreonam zonu ≤27 mm, sefotaksim zonu ≤27 mm ve seftriakson zonu ≤25 mm olan kökenler fenotipik GSBL doğrulama testi ile doğrulanmalıdır (65).

2.14.1.1.2. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton Agar (MHA) plağına yayılır. Petrinin ortasına amoksisilin/klavulanik asit (20/10µg), etrafına disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, sefpodoksim (10µg), aztreonam (30 µg), seftazidim (30µg), sefotaksim (30µg), sefoksitin (30µg) antibiyotik diskleri penset yardımıyla steril bir şekilde yerleştirilir ve 37 °C'de 16-18 saat inkübe edilir. Sefalosporin veya aztreonam arasındaki inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanik asit diskine doğru

genişlemesi veya diğer antibiyotik diskleri arasında bakterin üremediği bir sinerji alanı oluşturması GSBL pozitif kabul edilir (64).

2.14.1.1.3. Antimikrobiyal Dilüsyon Duyarlılık Testi

Seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson 1 µg/ml yoğunluğunda kullanılır. Bu antibiyotik yoğunluğunda üreme sefalosporin için MİK değerinin ≥ 2 µg/ml olması GSBL üretimi için şüphelidir ve fenotipik GSBL doğrulama testi ile doğrulanmalıdır (65).

2.14.1.2. GSBL Fenotipik Doğrulama Testleri

Disk diffüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azalması halinde doğrulama testleri kullanılmalıdır (64,66).

2.14.1.2.1. Kombine Disk Doğrulama Testi (KDDT)

GSBL varlığının fenotipik doğrulaması için MHA'da klavulanik asitli (10 µg) ya da klavulanik asitsiz sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerinin kullanımı önerilmektedir. Sefalosporin diski ve sefalosporin/klavulanik asit diski inhibisyon zonu çapları arasında ≥ 5 mm'lik fark olması GSBL üretimini doğrulamaktadır (65). Bir diğer yöntemde de klavulanik asit içeren ve içermeyen diskler etrafındaki inhibisyon zonların oranlanması ile 1.5 değerinin saptanması GSBL aktivitesini gösterir (64,66).

2.14.1.2.2. Broth Mikrodilüsyon

Fenotipik doğrulama broth mikrodilüsyon testi; seftazidim (0.25-128 µg/ml), seftazidim/klavulanik asit (0.25/4-128/4 µg/ml), sefotaksim (0.25-64 µg/ml) ve sefotaksim/klavulanik asit (0.25/4-64/4 µg/ml) kullanılarak yapılır. Sefalosporin /klavulanik asit kombinasyonu ile yapılan sadece sefalosporinle yapılan teste göre MİK değerinde ≥ 3 dilüsyonluk azalma fenotipik olarak GSBL varlığını doğrular (65).

Tarama ve fenotipik doğrulama testlerinde kalite kontrol için GSBL üretmeyen *E.coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 ve GSBL üreten *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılmalıdır.

GSBL saptanmasında kullanılan diğer metodlar; iso-sensitest agarda sefalosporin/klavulanik asit kombinasyon diskleri (67), klavulanik asit eklenmiş agar (68), disk replasman yöntemi (69), üç-boyutlu test (70), E test yöntemi (68,71,72), otomotize sistemler (73) ve moleküler saptama yöntemleridir (4,74). GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri Tablo 5'te, GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri ise Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri (75)

Yöntemler	Olumlu Özellikleri	Olumsuz Özellikleri
Standart CLSI* Kriterleri (Antibiyotik duyarlılık testleri)	Kullanımı kolay, her laboratuvarında uygulanabilir	GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir
CLSI GSBL** doğrulama testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılık seçilen oksiiimino-sefalosporinlere göre değişir
Çift disk sinerji testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Uygulanan diskler arasındaki mesafe standart değil
Üç boyutlu test	Duyarlı, yorumu kolay	GSBL için özgül değil, emek yoğun
E-test GSBL şeritleri	Kullanımı kolay	Yorum her zaman kolay değil, çift-disk sinerji testi kadar duyarlı değil
Vitek 2 GSBL testi***	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılığı düşük

*CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

**GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

***(bioMérieux, Fransa)

Tablo 6. GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri (75)

Moleküler Yöntem	Olumlu Özellikleri	Olumsuz Özellikleri
DNA Probları	Gen ailesi için özgül (örn; TEM veya SHV)	Emek yoğun, genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırt etmez
PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	Kolay uygulanır, gen ailesi için özgüldür (örn; TEM veya SHV)	Genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırt etmez
Oligotiplendirme	Özgül TEM türlerini saptar	Özgül oligonükleotid problemleri gerektirir, emek yükündür, yeni türevleri saptayamaz
PZR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Kolay uygulanır, nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir	Saptanabilmesi için nükleotid değişikliklerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gerekir
PZR- SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism)	Çeşitli SHV türevlerini ayırdedebilir	Özel elektroforez koşullarını gerektirir
LCR (Ligase Chain Reaction)	Çeşitli SHV türevlerini ayırdedebilir	Çok sayıda oligonükleotid primerine gereksinim gösterir
Nükleotid dizi analizi	Altın standarttır, tüm türevleri saptayabilir	Emek yoğun, teknik olarak zor olabilir, manuel yöntemleri yorumlamak güç olabilir

CLSI'da rutin uygulamada GSBL saptanmasına gerek olmadığı, GSBL'nin epidemiyolojik olarak incelenmek için veya enfeksiyon kontrolü amacıyla tanımlanması önerilmiştir. Test sonuçları yorum yapmadan bildirilmelidir. Yani GSBL saptansa bile beta laktam antibiyotiklere etken duyarlı ise sonuçta duyarlı olarak verilmelidir (65).

2.14.2. MBL Tanı Yöntemleri

MBL'ler hareketli integronların yardımıyla Gram negatif bakteriler arasında yayılmaktadır. MBL üreten suşlar aztreonam hariç tüm beta laktamlara dirençlidirler. MBL üreten etkenle infekte hastaların uygun tedavisi için bu direncin tanımlanması ve daha sonra da yayılmasının kontrol edilebilmesi gerekmektedir. Ancak günümüzde MBL için CLSI'nın önerdiği bir tarama testi bulunmamaktadır (76,77). Modifiye Hodge testine ek olarak MBL aktivitesinin EDTA veya merkaptopropionik asit (MPA) gibi metal şelatör ajanlarla bloke edilmesi esasına dayanan birçok MBL tarama çalışmaları yapılmıştır (78).

2.14.2.1. Modifiye Hodge Test

Lee ve arkadaşları (76,77) MBL enzimini saptamak için Hodge testini modifiye ederek geliştirmişlerdir. Bu test için *E. coli* ATCC 25922 standart kökeni, ertapenem diski (10 µg) veya meropenem diski (10 µg) ile test edilecek bakteri kökeni gerekmektedir. Standart *E.coli* kökeni kültür süspansiyonları 1/10 oranında Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyeri ile seyreltikten sonra MHA besiyerine uygun şekilde ekilir. Plak kuruyunca ortasına ertapenem diski (10 µg) veya meropenem diski (10 µg) yerleştirilir. Test edilecek kökenin 18-24 saatlik kültüründen 10 µl'lik bir öze veya eküvyon ile 3-5 koloni alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20-25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilir ve plaklar etüvde 35±2 °C'de 16-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilir. İnkübasyon sonrasında inhibisyon zonunda yonca yaprağı şeklinde bozulmanın olması MBL pozitifliği olarak kabul edilir (65).

2.14.2.2. ÇDST

MBL saptanması çalışmalarında imipenem ve seftazidim disklerinin EDTA, MPA, merkaptasetik asit (SMA) emdirilmiş disklerle yapılan ÇDST kullanılmıştır. Bu testler (78);

- IMP-EDTA ÇDST
- IMP-MPA ÇDST
- CAZ-MPA ÇDST

- CAZ-SMA ÇDST
- IMP-EDTA-SMA ÇDST

2.14.2.3. E-test Yöntemi

İmipenem ve seftazidime, EDTA ya da 2-MPA eklenerek E-test stripleri geliştirilmiştir. MHA'ya CLSI'nın önerdiği şekilde test edilecek kökenlerin besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden 4-5 koloni alınıp MHB besiyerine ekilerek 37 °C'de 2-3 saat bekletilir. Bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı MHB eklenerek 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak eküvyon yardımı ile MHA plaklarına bakteri ekimi yapılır. On beş dakika kurumaya bırakıldıktan sonra plak yüzeylerine bir tarafı imipenem (IP), diğer tarafı imipenem ve EDTA (IPI) içeren E-test stripleri yerleştirilir. 35 °C'de inkübe edilir ve 16-18 saat sonra MIK_{IP} / MIK_{IPI} değeri 8 veya 8'den büyük ise ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilir (65,79).

2.14.2.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerden en çok kullanılanlar blot hibridizasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), poliakrilamid jel elektroforezi, izoelektrik fokuslama ve nükleotid sekans amplifikasyon yöntemleridir (76).

Kombine disk diffüzyon testi ve mikrodilüsyon test MBL tanısında kullanılan diğer yöntemlerdir (79-82).

2.14.3. AmpC Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri

2.14.3.1. İndüklenebilir AmpC Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri

2.14.3.1.1. Disk İndüksiyon Testi (DİT)

İBL varlığı DİT ile gösterilebilir. Bu testte kuvvetli indükleyiciler olan sefoksitin veya imipenem diskleri, aztreonam veya üçüncü kuşak sefalosporin diskleriyle aralarındaki mesafe 2 cm olacak şekilde yerleştirilir. Sefalosporin diskinin zonunda indükleyiciye bakan tarafta bir düzleşme olması, zayıf indükleyici disklerdeki inhibisyon zonunun en az 4 mm'lik küçülmesi İBL varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilir (26,83-87).

2.14.3.1.2. İndükleyici Ajanın Besiyerine Eklenmesi

Standart miktarda imipenem içeren ve imipenem içermeyen iki ayrı besiyeri alınır. Bu besiyerlerine sefotaksim veya diğer uygun beta laktam antibiyotik diskleri yerleştirilir. İmipenem içeren besiyerindeki inhibisyon çapının imipenem içermeyene kıyasla 3 mm veya daha dar olması İBL varlığını gösterir (83,85,86).

2.14.3.1.3. Moleküler Yöntemler

Fenotipik testler AmpC beta laktamaz varlığını gösterebilir bile üretilen AmpC beta laktamazın kromozomal ya da plazmid kökenli olduğunu ayırt edemez. Bu nedenle AmpC tipi beta laktamaz saptanmasında altın standart PZR ve dizi analizidir (26).

Kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile de *P.aeruginosa*'da antibiyotik direnç geni ekspresyonu analizi yapılabilir (88).

2.14.3.2. Plazmid Kaynaklı AmpC Beta Laktamaz Tanı Yöntemleri

2.14.3.2.1. Üç boyutlu Test Yöntemi

Bulanıklığı 0.5 McFarland olarak ayarlanmış standart *E.coli* kökeni kültür süspansiyonu uygun şekilde MHA yüzeyine ekilir. Plak kuruyunca ortasına 30 µg'lık sefoksitin diski yerleştirilir. Diskin dış kenarının 5 mm uzağından steril bir bistüri ile petrinin dış kenarına kadar besiyeri kesilir. Bu boşluğa AmpC beta laktamaz enzimi aranan suşun enzim ekstraksiyonu konularak sefoksitin zon çapındaki daralma değerlendirilir (87).

2.14.3.2.2. Kloksasilin İnhibisyon Testi

Kloksasilin, AmpC beta laktamaz inhibisyonu yapar. Bu etkisinden dolayı kloksasilin 250 µg/ml olacak şekilde MHA besiyerine eklenir. Kökenlerin kültür süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanır. Bu süspansiyon kloksasilinli ve kloksasilinsiz MHA besiyeri yüzeyine uygun şekilde yayılır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra ortasına üçüncü kuşak sefalosporin diski konulur. 37 °C'de bir gece inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirilir. Aynı kökenin kloksasilinsiz besiyerindeki üçüncü kuşak sefalosporin diskinin zon çapı, kloksasilinli

besiyerindeki oranla 10 mm veya daha fazla artış göstermişse sonuç AmpC beta laktamaz pozitif olarak kabul edilir (89).

2.14.3.2.3. Sefoksitin Agar Besiyeri Yöntemi

Üç boyutlu test yöntemine benzer fakat disk yerine denenecek bakterinin duyarlı olduğu konsantrasyon sınırları içinde çift kat seri sulandırım ile hazırlanmış sefoksitin süspansiyonu (2, 4, 6, 8, 16 µg/ml) MHA besiyerine katılır. Daha sonra besiyerinde açılan kuyucuğa bakterinin enzim ekstraksiyonu konur. Kuyucuğun çevresinde normalde ürememesi gereken sefoksitine duyarlı standart *E.coli* kökeninin üremesi esasına dayanarak yapılır (87).

2.14.3.2.4. Boronik Asit İnhibisyon Testi

Boronik asit ve türevleri de uzun süredir AmpC beta laktamaz inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Boronik asit ve türevleri ya doğrudan beta laktam disklerine ya da boş disklerle damlatılarak uygulanmaktadır. Kombine disklerle oluşan inhibisyon zonunun boronik asit içermeyen disk zonlarına göre 5 mm artması pozitif test kriteridir. Boronik asit türevleri ayrıca AmpC beta laktamaz üreten türlerde GSBL saptanması için de kullanılmaktadır (26).

2.14.3.2.5. Moleküler Yöntemler

Üretilen AmpC beta laktamazın kesin olarak kromozomal ya da plazmid kökenli olduğunu ve plazmid kökenli ise AmpC beta laktamazlardan hangisini ürettiğini saptamak için PZR ve dizi analizi yapılmalıdır (26,90).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bakteri Kökenleri

Haziran 2011-Eylül 2012 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden (idrar, yara, bronkoalveolar lavaj, balgam, trakeal aspirat, plevral sıvı, kan) izole edilen 100 *Pseudomonas aeruginosa* kökeni çalışmaya dahil edildi.

Antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) ile saptanmış olan bu *P.aeruginosa* kökenleri saf koloniler şeklinde izole edildikten sonra %20 gliserin içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek -70 °C'de saklandı. Çalışılacağı zaman kökenler EMB (bioMérieux, Fransa) ve Kanlı Agar (bioMérieux, Fransa) besiyerine pasajları yapıldı.

3.2. Bakterilerin Klinik Örneklerden İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

P.aeruginosa kökenlerinin tanımlanmasında EMB ve kanlı agar besiyerinde karakteristik koloni görünümü, %5 koyun kanlı beyin kalp infüzyon agarda beta hemolitik koloni görünümü, karakteristik kokusu, hareketli olması, oksidaz enziminin varlığı, 42 °C'de üreme, lizin dekarboksilaz enziminin olmaması, glukozu, laktoz ve sukrozu fermente etmemesi ile MHA (bioMérieux, Fransa) besiyerinde yeşilimsi renk değişikliği yapması özellikleri araştırıldı. Gerekliğinde kökenlerin tanımlanması Vitek 2 otomatize sistemi ile doğrulandı. Tüm kökenlerin amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, seftazidim, sefepim, imipenem,

meropenem, piperasilin ve piperasilin/tazobaktama karşı duyarlılıkları da Vitek 2 otomatize sistemi ile belirlendi. AmpC tipi beta laktamaz tespiti için yapılan DİT sırasında aztreonam diskinin inhibisyon zonu ölçüldü ve bu ölçümler CLSI kriterlerine göre değerlendirilerek aztreonam duyarlılığı tespit edildi (65).

3.3. Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.3.1. Kanlı Agar

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

3.3.2. Eosin Methylene Blue Agar

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

3.3.3. Mueller-Hinton Agar

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

3.3.4. Mueller-Hinton Broth (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 21 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere her tüpte 10 ml olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.5. Tryptic Soy Broth

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 30 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 200 ml gliserin eklendi. Steril ependorf tüplere her tüpte 1 ml olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.6. Triple Sugar Iron Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 65 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere tüpler yaklaşık 45°'lik açı yapacak şekilde yerleştirilerek her tüpe 10 ml besiyeri dağıtıldı.

3.3.7. SIM Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 30 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere her tüpte 10 ml olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.8. Lysine Iron Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 32 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere tüpler yaklaşık 45°'lik açı yapacak şekilde yerleştirilerek her tüpe 10 ml besiyeri dağıtıldı.

3.3.9. Beyin Kalp İnfüzyon Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 52 g tartılıp 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 50 ml koyun kanı eklenerek besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 ml besiyeri olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.10. Fosfat Tamponlu Su (FTS)

Tamponu hazırlamak için 8 g NaCl (Merck, Almanya), 0.2 g KCl (Merck, Almanya), 0.24 g KH₂PO₄ (Merck, Almanya) ve 1.44 g Na₂HPO₄ (Merck, Almanya) tartılıp bir balon jöjeye konuldu ve solüsyon 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde balon

jojeye distile su eklendi. Kimyasal maddeler distile su içinde çözüldükten sonra pH 7.4'e ayarlandı. Solüsyon 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.3.11. Oksidaz Ayıracı

N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-fenilen diamin dihidroklorür (Merck, Almanya)'den 0,05 g tartılıp ışık geçirmeyen bir kaba alındı ve üzerine 5 ml distile su eklenerek %1'lik sitokrom oksidaz ayıracı solüsyonu hazırlandı.

3.3.12. Agaroz Jel

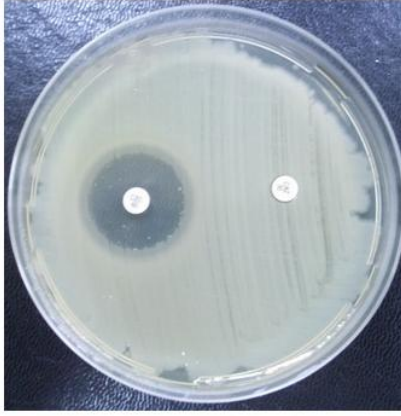
Agaroz jelin hazırlanmasında Tris/Borate/EDTA (TBE) (Fermentas, ABD) tamponu kullanıldı. TBE (10X) solüsyonundan 0.5X TBE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi. 2 g agaroz (Sigma, ABD) tartılarak 100 ml'lik bir erlenmayere konuldu, 100 ml 0.5X TBE tamponu eklendi (% 2'lik agaroz). Mikrodalga fırında 2 dakika kaynatıldı. 10 mg/ml'lik etüdyum bromid (Merck, Almanya)'den 10 µl ilave edildi. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1 mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi. Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulan agaroz jel, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kullanıma hazır hale getirildi.

3.4. Metod

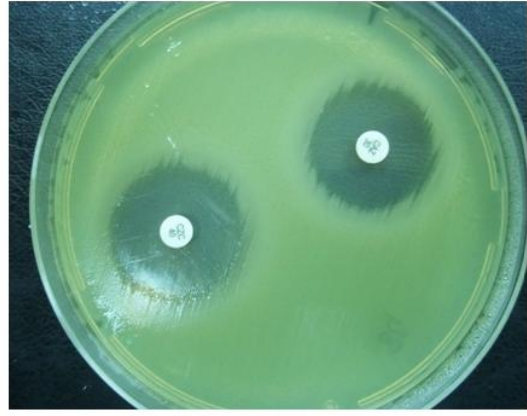
3.4.1. GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi

Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* kökenleri -70 °C'den çıkarılarak, EMB besiyerine pasajlandı. 37 °C'de etüvde inkübe edildi, inkübasyon sonrasında *P.aeruginosa* kökenlerinin EMB besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden 4-5 koloni alınıp MHB besiyerine ekilerek 37 °C'de 3 saat bekletildi. Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak eküvyon yardımı ile kökenler MHA besiyerine uygun şekilde ekildi ve besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra diskler besiyeri üzerine konuldu. Bir besiyeri üzerine seftazidim (30 µg)/ klavulanik asit (10 µg) (Bioanalyse, Türkiye) içeren kombinasyon diskleri ve klavulanik asit içermeyen seftazidim (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diskleri yerleştirildi. Bir günlük inkübasyondan sonra inhibisyon zonları ölçüldü. Kombinasyon disklerinin

inhibisyon zon çapının sadece seftazidim içeren disklerin inhibisyon zon çapından ≥ 5 mm genişleme göstermesi veya kombinasyon disklerinin inhibisyon zonunun sadece seftazidim içeren disklerin inhibisyon zonuna oranı ≥ 1.5 olarak tespit edilmesi GSBL pozitif olarak kabul edildi (Resim 2). GSBL tarama ve doğrulama testlerinde GSBL pozitif kontrol kökeni olarak *K.pneumoniae* ATCC 700603 ve GSBL negatif kontrol kökeni olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.



GSBL pozitif



GSBL negatif

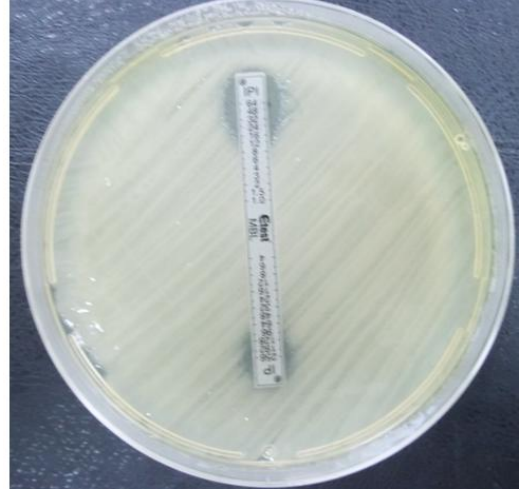
Resim 2. Seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit kombine disk doğrulama testi

3.4.2. MBL Varlığının E-Test Yöntemi ile Araştırılması

P.aeruginosa kökenlerinde MBL varlığının araştırılması için E-test yöntemi kullanılmıştır. *P.aeruginosa* kökenlerinin kanlı agar besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden 4-5 koloni alınıp MHB besiyerine ekilerek 37 °C’de 3 saat bekletildi. Bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı MHB eklenerek 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak eküvyon yardımı ile MHA plaklarına yayıldı. Onbeş dakika kurumaya bırakıldıktan sonra üzerlerine bir tarafı imipenem (IP) (4-256 µg/ml), diğer tarafı imipenem (1-64 µg/ml) ve EDTA (IPI) içeren E-test (bioMérieux, Fransa) şeritleri yerleştirildi. 37 °C’de 16-20 saat inkübe edildikten sonra MIK değerleri belirlendi. MIK_{IP} / MIK_{IPI} değeri 8 veya 8’den büyük ise ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitif olarak değerlendirildi (Resim 3).



MBL negatif

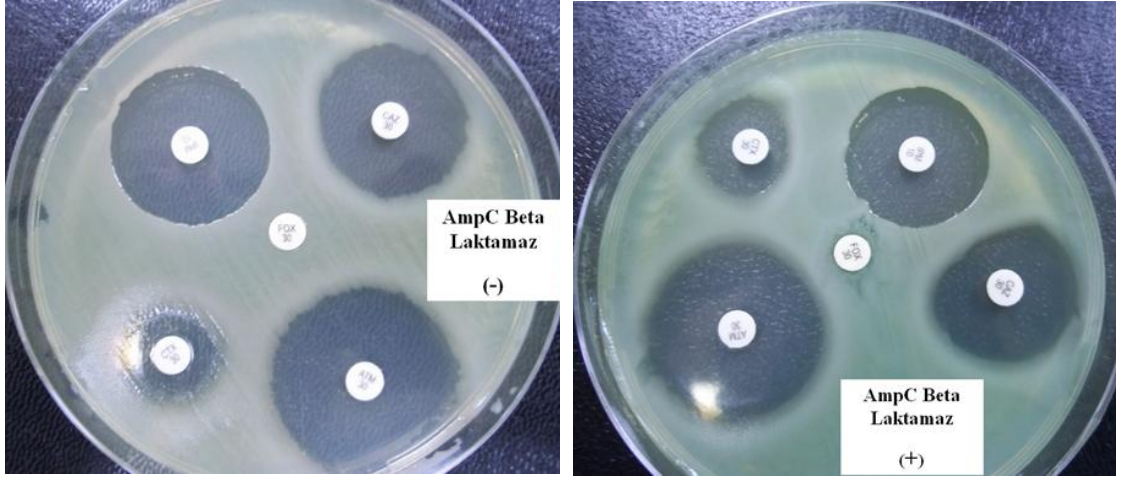


MBL pozitif

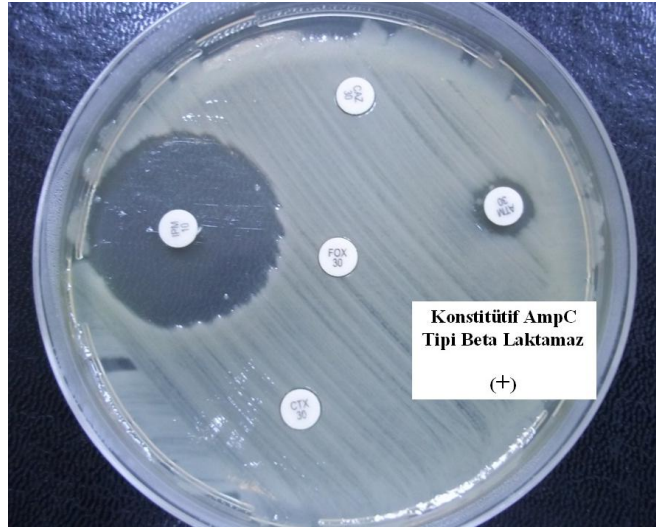
Resim 3. Metallo beta laktamaz varlığının E-test yöntemiyle saptanması

3.4.3. AmpC Tipi Beta Laktamaz Varlığının Disk İndüksiyon Testi ile Araştırılması

AmpC tipi beta laktamazın tanımlanması sefoksitine direnç ve disk indüksiyon testiyle yapıldı. *P.aeruginosa* kökenlerinin kanlı agar besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden 4-5 koloni alınıp MHB besiyerine ekilerek 37 °C’de 3 saat bekletildi. Bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı MHB eklenerek 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak eküvyon yardımı ile MHA plaklarına yayıldı. MHA’nın üzerine ortada güçlü indükleyici olarak sefoksitin (30 µg) diski, bundan 25 mm uzaklıkta olacak şekilde seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), aztreonam (30 µg) ve imipenem (10 µg) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirildi. Disk indüksiyon testinde aztreonam ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin, sefoksitin veya imipenem gibi güçlü indükleyicilere bakan yüzlerinde bir düzleşme olması, zayıf indükleyici disklerdeki inhibisyon zonunun en az 4 mm’lik küçülmesi indüklenebilir AmpC tipi beta laktamaz varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi (Resim 4). Geniş spektrumlu sefalosporinlere, aztreonama, sefoksitine dirençli, imipeneme duyarlı bakteriler konstitütif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif olarak değerlendirildi (Resim 5).



Resim 4. AmpC beta laktamaz varlığının disk induksiyon testi ile saptanması



Resim 5. Konstitüif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif köken

3.4.4. PZR Yöntemi ile *AmpC* Geni Varlığının Araştırılması

3.4.4.1. DNA İzolasyonu

Bakterilerin DNA izolasyonu ticari olarak temin edilen DNA ekstraksiyon kiti (Roche, Almanya) ile üreticisinin tarifine uygun olarak yapıldı.

DNA ekstraksiyon kitinin içeriği:

1. Doku lizis tamponu, 20 ml
2. Bağlama tamponu, 20 ml
3. Proteinaz K
4. İnhibitor uzaklaştırıcı tampon, 33 ml
5. Yıkama tamponu, 20 ml
6. Elüsyon tamponu, 40 ml
7. Filtreli tüpler (100 adet)
8. Toplama tüpleri (2 ml'lik 400 adet)

DNA izolasyonuna EMB besiyerinde saf olarak üreyen bakterilerden 5 koloni alınarak 200 µl FTS içinde süspanse edilerek başlandı. Süspansiyon 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı döküldü. Eppendorf tüplerdeki pellet üzerine 200 µl FTS eklenip süspanse edildi. Üzerine 5 µl lizozim (Merck, Almanya) enzimi eklenerek ısı bloğunda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Süspansiyona 200 µl bağlama tamponu ve sonrasında 40 µl proteinaz K eklendi. Isı bloğunda 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 100 µl izopropanol (Sigma, ABD) eklendi ve süspanse edildi. Süspansiyon filtreli toplama tüplerine aktararak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpleri yenileriyle değiştirildi. Filtreli toplama tüplerine 500 µl inhibitor uzaklaştırıcı tampon eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpleri yenileriyle değiştirildi. Filtreli toplama tüplerine 500 µl yıkama tamponu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpleri yenileriyle değiştirildi. Filtreli toplama tüplerine tekrar 500 µl yıkama tamponu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpleri yenileriyle değiştirildikten sonra 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpleri, eppendorf tüplerle değiştirilerek filtre üzerine 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl elüsyon tamponu eklendi. Filtreli eppendorf tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve filtreler atıldı.

Ependorf tüplerde elüsyon tamponu ile süspansiyon halinde olan DNA -20 °C’de kullanılmaya kadar saklandı.

3.4.4.2. *AmpC* Genlerinin Amplifikasyonu

AmpC genlerinin amplifikasyonu Dumas ve ark. (88)’lerinin makalelerinde belirttiği primer (Tablo 7) kullanılarak PZR yöntemiyle yapıldı.

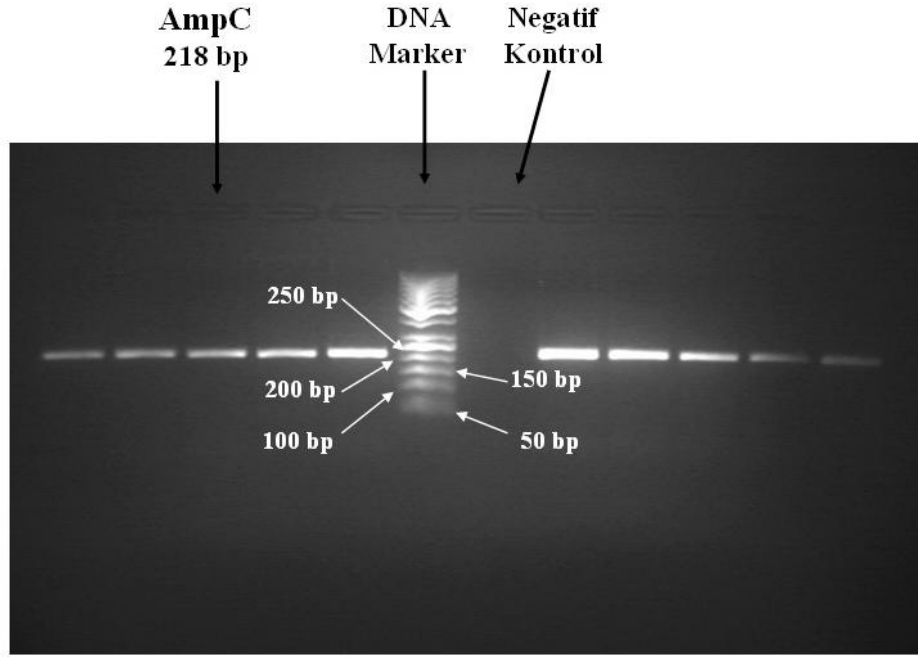
Tablo 7. Kullanılan Primer

Primer	Oligonükleotid Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bp)
<i>AmpC1</i>	5’-CGGCTCGGTGAGCAAGACCTTC-3’	218
<i>AmpC2</i>	5’-AGTCGCGGATCTGTGCCTGGTC-3’	

PZR karışımı 25 µl total hacimde 2.5 µl Taq tamponu (10X) (Fermantas, ABD), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM) (Fermantas, ABD), 1 µl dNTP (10mM) (Fermantas, ABD), her bir primerden 0.5 µl (50 pmol) ve 2 µl kalıp DNA olacak şekilde hazırlandı. PZR işlemi Techne Flexigene Thermal Cycler (Techne Flexigene, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. Ön denatürasyon (94 °C’de 4 dakika) aşamasını takiben 0.25 µl Taq polimeraz (5U/µl) (Fermantas, ABD) eklendi. Sonrasında toplam 30 siklus olacak şekilde 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, 57 °C’de 45 saniye bağlanma ve 72 °C’de 45 saniye uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72 °C’de 10 dakika son uzama işlemi yapıldı.

3.4.4.3. Amplifiye Edilen Gen Ürününün Gösterilmesi

Amplifiye edilen PZR ürünleri negatif kontrol ve DNA marker (50 bp) (Fermantas, ABD) ile birlikte, elektroforez tankında (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) bulunan 0.5X TBE tamponu içindeki %2’lik agaroz jele 10 µl PZR ürünü, 3µl yükleme boyası (6X) (Fermantas, ABD) ile karıştırılarak yüklendi. 150 Volt’da 30 dakikalık elektroforez işleminden sonra görüntüleme cihazında (Wealtec Dolphin-View, ABD) incelendi ve 218 bp’lik gen ürünlerinin varlığı yönünden değerlendirildi (Resim 6).



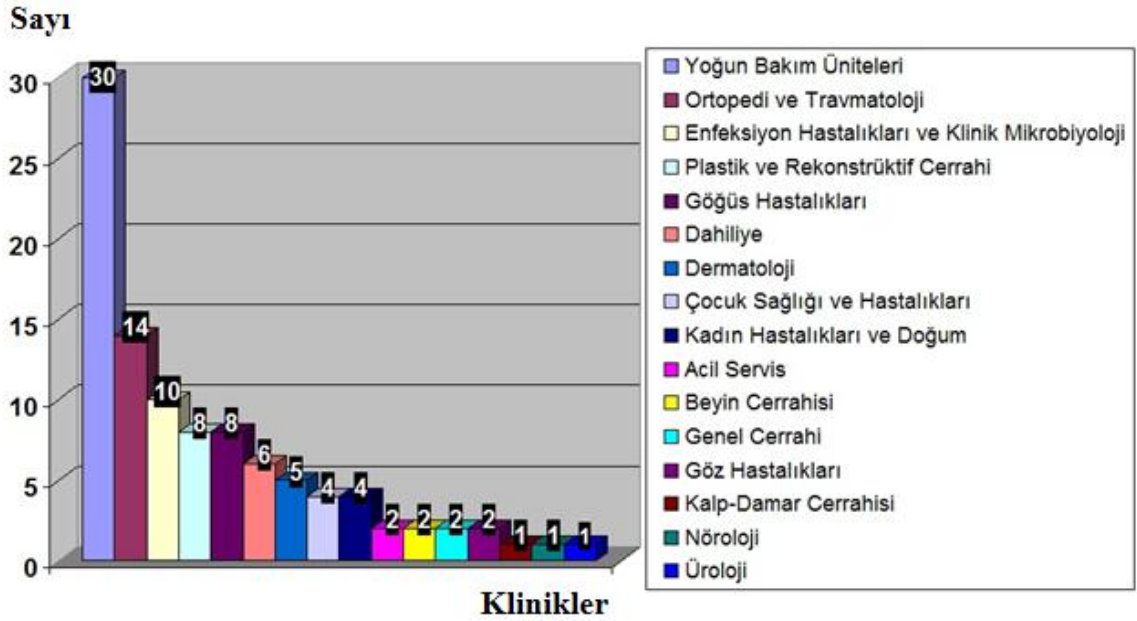
Resim 6. Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 16.0 paket programı (Chicago, ABD) kullanılarak analiz edildi. Verilerin sunumunda frekans ve yüzde dağılımları kullanıldı. Testlerin birbiriyle karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

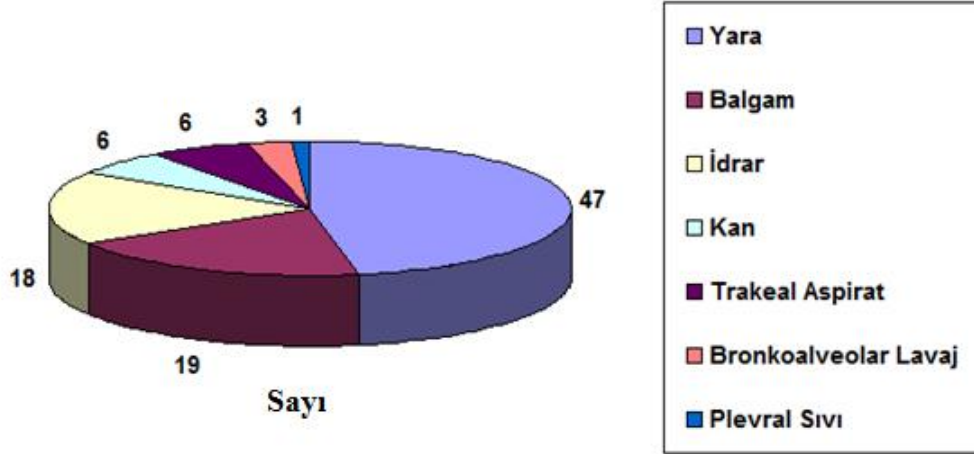
4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* kökenlerinin izole edildiği örneklerin 30'unun (%30) Yoğun Bakım Üniteleri, 14'ünün (%14) Ortopedi ve Travmatoloji, 10'unun (%10) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, sekizinin (%8) Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi, sekizinin (%8) Göğüs Hastalıkları, altısının (%6) Dahiliye, beşinin (%5) Dermatoloji, dördünün (%4) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, dördünün (%4) Kadın Hastalıkları ve Doğum, ikisinin (%2) Acil Servis, ikisinin (%2) Beyin Cerrahisi, ikisinin (%2) Genel Cerrahi, ikisinin (%2) Göz Hastalıkları, birinin (%1) Kalp-Damar Cerrahisi, birinin (%1) Nöroloji ve birinin de (%1) Üroloji kliniklerinden gönderildiği tespit edildi (Grafik 1).



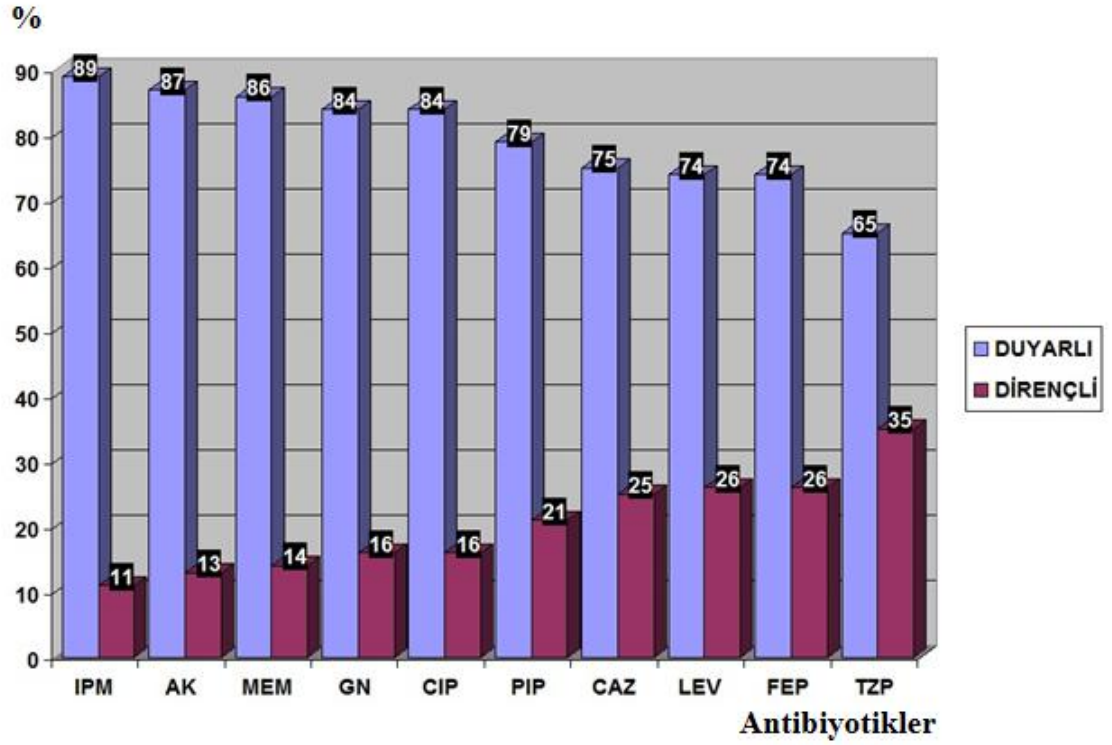
Grafik 1. Kökenlerin izole edildiği örneklerin gönderildiği klinikler

Kökenlerin 47'sinin (%47) yara, 19'unun (%19) balgam, 18'inin (%18) idrar, altısının (%6) kan, yine altısının (%6) trakeal aspirat, üçünün (%3) bronkoalveolar lavaj ve birinin (%1) de plevral sıvı örneklerinden izole edildiği tespit edildi (Grafik 2).



Grafik 2. Çalışmada değerlendirilen örneklerin dağılımı

Çalışılan kökenlerin en duyarlı olduğu antibiyotikler imipenem (%89), amikasin (%87), meropenem (%86), gentamisin (%84) ve siprofloksasin (%84) olarak saptandı. Kökenlerin en dirençli olduğu antibiyotikler ise piperasilin/tazobaktam (%35), sefepim (%26), levofloksasin (%26), seftazidim (%25) ve piperasilin (%21) olarak belirlendi. Kökenlerin antibiyotiklere direnç ve duyarlılık oranları Grafik 3'te gösterilmiştir.



IPM: İmipenem, AK: Amikasin, MEM: Meropenem, GN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, PIP: Piperasilin, CAZ: Seftazidim, LEV: Levofloksasin, FEP: Sefepim, TZP: Piperasilin/tazobaktam.

Grafik 3. Kökenlerin antibiyotiklere direnç ve duyarlılık oranları

Kökenlerin otomatize sistem ile belirlenen 10 antibiyotik için MİK değerleri Tablo 8’de sunuldu. Bu sonuçlara göre MİK₅₀ değerleri (bakterilerin en az %50’sine etkili olabilmek için gereken MİK değeri) duyarlılık sınırı içinde kalan antibiyotikler amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, seftazidim, sefepim, imipenem, meropenem, piperasilin ve piperasilin/tazobaktamdı. MİK₉₀ değerleri (bakterilerin en az %90’ına etkili olabilmek için gereken MİK değeri) duyarlılık sınırı içinde kalan hiçbir antibiyotik saptanmadı.

Tablo 8. *P.aeruginosa* kökenlerine karşı 10 antibiyotiğin µg/ml cinsinden minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri (n=100)

Antibiyotik	Sınır değerler	MİK Aralığı**	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
					n (%)	n (%)	n (%)
Amikasin	≤16 - ≥64	≤2 - ≥64	≤2	32	87 (%87)	5 (%5)	8 (%8)
Gentamisin	≤4 - ≥16	≤1 - ≥16	≤1	8	84 (%84)	8 (%8)	8 (%8)
Siprofloksasin	≤1 - ≥4	≤0.25 - ≥4	≤0.25	≥4	84 (%84)	2 (%2)	14 (%14)
Levofloksasin	≤2 - ≥8	≤0.12 - ≥8	1	≥8	74 (%74)	10 (%10)	16 (%16)
Seftazidim	≤8 - ≥32	≤1 - ≥64	4	≥64	75 (%75)	10 (%10)	15 (%15)
Sefepim	≤8 - ≥32	≤1 - ≥64	2	32	74 (%74)	14 (%14)	12 (%12)
İmipenem	≤4 - ≥16	≤0.25 - ≥16	2	8	89 (%89)	4 (%4)	7 (%7)
Meropenem	≤4 - ≥16	≤0.25 - ≥16	0.5	≥16	86 (%86)	3 (%3)	11 (%11)
Piperasilin	≤64 - ≥128	≤4 - ≥128	16	≥128	79 (%79)	0 (%0)	21 (%21)
TZP*	≤64/4 - ≥128/4	≤4/4 - ≥128/4	8/4	≥128/4	65 (%65)	16 (%16)	19 (%19)

*TZP: Piperasilin/tazobaktam

**Bizim çalışmamızdaki kökenlerin MİK aralığı

Seftazidim-seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CZC) KDDT ile dört (%4) köken GSBL pozitif olarak belirlendi. Bu kökenlerin E-test ile MBL negatif olduğu tespit edildi. Bu GSBL pozitif kökenlerin DİT ile üçünün AmpC beta laktamaz negatif ve birinin de konstitütif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif olduğu tespit edildi. Yine bu GSBL pozitif kökenlerin tamamında PZR yöntemiyle *AmpC* geni pozitif olarak saptandı.

Antibiyotik duyarlılıkları ile GSBL varlığı karşılaştırıldığında; GSBL pozitif olan kökenlerin amikasına, gentamisine, siprofloksasine, seftazidime, sefepime ve piperasilin/tazobaktama karşı daha dirençli olduğu (p<0.05), levofloksasine, imipeneme, meropeneme ve piperasiline karşı dirençli olmasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı (p>0.05) saptandı (Tablo 9).

Tablo 9. CAZ/CZC KDDT ile saptanan GSBL varlığı ve antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

Antibiyotik duyarlılık durumu		CAZ/CZC KDDT* ile saptanan GSBL** varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
Amikasin	Dirençli	10 (%10)	3 (%3)	13	0.007***
	Duyarlı	86 (%86)	1 (%1)	87	
Gentamisin	Dirençli	13 (%13)	3 (%3)	16	0.012***
	Duyarlı	83 (%83)	1 (%1)	84	
Siprofloksasin	Dirençli	13 (%13)	3 (%3)	16	0.012***
	Duyarlı	83 (%83)	1 (%1)	84	
Levofloksasin	Dirençli	23 (%23)	3 (%3)	26	0.053***
	Duyarlı	73 (%73)	1 (%1)	74	
Seftazidim	Dirençli	21 (%21)	4 (%4)	25	0.003***
	Duyarlı	75 (%75)	0 (%0)	75	
Sefepim	Dirençli	22 (%22)	4 (%4)	26	0.004***
	Duyarlı	74 (%74)	0 (%0)	74	
İmipenem	Dirençli	10 (%10)	1 (%1)	11	0.377***
	Duyarlı	86 (%86)	3 (%3)	89	
Meropenem	Dirençli	13 (%13)	1 (%1)	14	0.458***
	Duyarlı	83 (%84)	3 (%3)	86	
Piperasilin	Dirençli	21 (%21)	0(%0)	21	0.576***
	Duyarlı	75 (%75)	4 (%4)	79	
Piperasilin/Tazobaktam	Dirençli	31 (%31)	4 (%4)	35	0.013***
	Duyarlı	65 (%65)	0 (%0)	65	

*Kombine disk doğrulama testi **Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
***Fisher'ın kesin ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

E-test yöntemi ile tüm örneklerin sadece birinde (%1) MBL pozitif olarak bulundu. Yani imipeneme direçli 11 *P.aeruginosa* kökeninden birinde (%9.09) MBL pozitif olarak saptandı MBL varlığı ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilemedi. MBL pozitif olan bu kökenin; amikasinine, gentamisine, siprofloksasine, levofloksasine, seftazidime, sefepime, imipeneme, meropeneme, piperasiline ve piperasilin/tazobaktama dirençli, aztreonama duyarlı olduğu saptandı. Bu kökenin CAZ/CZC ile yapılan KDDT ile GSBL negatif, DİT ile AmpC beta laktamaz negatif, PZR ile *AmpC* geni pozitif olarak tespit edildi.

DİT ile örneklerin 73'ünde (%73) AmpC tipi beta laktamaz pozitif olarak bulundu. Bunların sekizi konstitütif (indüklenemeyen-stabil dereprese mutant) AmpC tipi beta laktamaz pozitif olarak değerlendirildi.

AmpC beta laktamaz enziminin etkilediği antibiyotikler göz önüne alınarak, DİT yöntemiyle AmpC beta laktamaz pozitif olarak saptanan kökenler ile bu kökenlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları karşılaştırıldığında (orta duyarlı olan kökenler dirençli kabul edildi); AmpC beta laktamaz pozitif 60 (%60) köken sefepime ve seftazidime duyarlı olarak bulundu ($p<0.05$). AmpC beta laktamaz pozitif 62 (%62) köken piperasiline duyarlı olarak bulunurken, piperasilin/tazobaktama 51 (%51) köken duyarlı olarak bulundu. AmpC beta laktamaz pozitif olan 70 (%70) köken imipeneme, 69 (%69) köken meropeneme, 60 (%60) köken ise aztreonama karşı duyarlı olarak bulundu ($p<0.05$). DİT yöntemiyle saptanan AmpC beta laktamaz varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. DİT yöntemiyle saptanan AmpC beta laktamaz varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

Antibiyotik duyarlılık durumu		DİT* yöntemiyle saptanan AmpC beta laktamaz varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
Seftazidim	Dirençli	12 (%12)	13 (%13)	25	0.006***
	Duyarlı	15 (%15)	60 (%60)	75	
Sefepim	Dirençli	13 (%13)	13 (%13)	26	0.002***
	Duyarlı	14 (%14)	60 (%60)	74	
İmipenem	Dirençli	8 (%8)	3 (%3)	11	0.001**
	Duyarlı	19 (%19)	70 (%70)	89	
Meropenem	Dirençli	10 (%10)	4 (%4)	14	0.000**
	Duyarlı	17 (%17)	69 (%69)	86	
Piperasilin	Dirençli	10 (%10)	11 (%11)	21	0.017***
	Duyarlı	17 (%17)	62(% 62)	79	
Piperasilin/Tazobaktam	Dirençli	13 (%13)	22 (%22)	35	0.094***
	Duyarlı	14 (%14)	51 (%51)	65	
Aztreonam	Dirençli	14 (%14)	13 (%13)	27	0.001***
	Duyarlı	13 (%13)	60 (%60)	73	

*Disk indüksiyon testi **Fisher'ın kesin ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

***Pearson ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

AmpC beta laktamaz enziminin etkilediği antibiyotikler göz önüne alınarak, PZR yöntemiyle *AmpC* geni pozitif olarak saptanan kökenler ile bu kökenlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları karşılaştırıldığında (orta duyarlı olan kökenler dirençli kabul edildi); *AmpC* geni pozitif 71 (%71) köken seftazidime ve

70 (%70) köken sefepime duyarlı olarak bulundu. *AmpC* geni pozitif 75 (%75) köken piperasiline duyarlı olarak bulunurken, piperasilin/tazobaktama 61 (%61) köken duyarlı olarak bulundu. *AmpC* geni pozitif olan 85 (%85) köken imipeneme, 82 (%82) köken meropeneme, 72 (%72) köken ise aztreonama karşı duyarlı olarak bulundu. PZR yöntemiyle saptanan *AmpC* geni varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki Tablo 11’de sunulmuştur.

Tablo 11. PZR yöntemiyle saptanan *AmpC* geni varlığı ile antibiyotiklere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

Antibiyotik duyarlılık durumu		PZR* yöntemiyle saptanan <i>AmpC</i> geni varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
Seftazidim	Dirençli	0 (%0)	25 (%25)	25	0.569**
	Duyarlı	4 (%4)	71 (%71)	75	
Sefepim	Dirençli	0 (%0)	26 (%26)	26	0.570**
	Duyarlı	4 (%4)	70 (%70)	74	
İmipenem	Dirençli	0 (%0)	11 (%11)	11	1.000**
	Duyarlı	4 (%4)	85 (%85)	89	
Meropenem	Dirençli	0 (%0)	14 (%14)	14	1.000**
	Duyarlı	4 (%4)	82 (%82)	86	
Piperasilin	Dirençli	0 (%0)	21 (%21)	21	0.576**
	Duyarlı	4 (%4)	75 (%75)	79	
Piperasilin/Tazobaktam	Dirençli	0 (%0)	35 (%35)	35	0.295**
	Duyarlı	4 (%4)	61 (%61)	65	
Aztreonam	Dirençli	3 (%3)	24 (%24)	27	0.059**
	Duyarlı	1 (%1)	72 (%72)	73	

*Polimeraz zincir reaksiyonu

**Fisher’ın kesin ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

PZR ile kökenlerin 96'sında (%96) *AmpC* geni pozitif olarak bulundu. Bunların 73 tanesinde DİT ile de *AmpC* beta laktamaz pozitif olarak bulunmuştu. PZR yöntemi ile saptanan *AmpC* geni varlığı ve DİT ile saptanan *AmpC* beta laktamaz varlığının karşılaştırılması Tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 12. PZR yöntemi ile saptanan *AmpC* geni varlığı ve DİT ile saptanan *AmpC* beta laktamaz varlığının karşılaştırılması

Testler ve yorumları		PZR** ile <i>AmpC</i> geni varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
DİT* ile <i>AmpC</i> beta laktamaz varlığı	Negatif	4 (%4)	23 (%23)	27	0.004***
	Pozitif	0 (%0)	73 (%73)	73	

*Disk indüksiyon testi

**Polimeraz zincir reaksiyonu

***Fisher'in kesin ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

P.aeruginosa tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüksek ekonomik maliyet ile yüksek morbidite ve mortalite oranları ile seyreden hastane infeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. *P.aeruginosa* zor çevre koşullarında üreyebilen ve çeşitli virulans faktörlerine sahip bir bakteridir. Ayrıca hem doğal olarak var olan hem de sonradan geliştirdiği direnç mekanizmaları ile çoklu antibiyotik direncinin geliştiği bir bakteri olarak da karşımıza çıkabilmektedir (91). *P.aeruginosa* farklı gruptaki birçok antibiyotiğe direnç göstermektedir. Her antibiyotik grubuna karşı direnç mekanizması farklıdır. *P.aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnç gelişiminde en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir. Bu beta laktamazlar AmpC tipi beta laktamaz, GSBL ve karbapenemazlardır (92).

Dirençli bakterilerin en fazla bulunduğu hastane ortamlarından birisi de yoğun bakım üniteleridir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde dirençli bakterilere bağlı infeksiyonlar zamanla giderek artmaktadır. Bunun en önemli sebebi antibiyotiklerin bilinçsiz şekilde aşırı olarak kullanılmasıdır (15,78,93). Çalışmamızda *P.aeruginosa* kökenleri en sık yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Kökenlerin örneklere göre dağılımı incelendiğinde en çok yara, daha sonra balgam ve idrar örneklerinden elde edildiği görülmüştür. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda da *P.aeruginosa* en sık yoğun bakım ünitesinden izole edilmiş olup, sıklıkla izole edildikleri klinik örnekler trakeal aspirat, idrar ve yara kültürüdür (44,78,94).

Ülkemizde *P.aeruginosa* kökenlerinde yapılan çalışmalarda direnç oranları imipeneme karşı %10-71, amikasinine karşı %4-46.4, meropeneme karşı %18-60, gentamisine karşı %14-75, siprofloksasine karşı %13-52, piperasiline karşı % 11-79, seftazidime karşı %16-70, levofloksasine karşı %31-51, sefepime karşı %17-87 ve piperasilin/tazobaktama karşı %8-97 arasında saptanmıştır (95-109). Bu çalışmalardaki ve bizim çalışmamızdaki direnç oranları Tablo 13'te sunulmuştur.

Tablo 13. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları (%)

Kaynak	Yıl	Antibiyotikler*									
		IPM	AK	MEM	GN	CIP	PIP	CAZ	LEV	FEP	TZP
Özer ve ark. (95)	2006	48	44	44	56	28	56	48	TE**	48	44
Doğan ve ark. (96)	2010	31	13	TE	14	TE	TE	36	31	36	TE
Öztürk ve ark. (97)	2010	23	4	TE	25	14	28	23	TE	87	21
Aktepe ve ark. (98)	2010	26.8	4.9	26	16.3	33.3	TE	70	37.4	70	61.8
Arabacı ve Oldacay (99)	2010	18.5	24.1	TE	33.3	27.8	TE	40.7	TE	40.7	20.4
Üstün (100)	2010	TE	31	TE	61	35	58	55	TE	49	TE
Berktaş ve ark. (101)	2011	60	9	TE	75	32	79	40	44	TE	TE
Öztürk ve ark. (102)	2011	18	7	TE	23	13	11	45	TE	60	8
Paköz ve ark. (103)	2011	36	13	TE	23	TE	TE	32	37	40	97
Türk Dağı ve ark. (104)	2011	30	18	TE	35	28	25	32	TE	41	18
Ağca ve ark. (105)	2011	34	17	TE	49	52	TE	22	TE	36	20
Berktaş ve ark. (106)	2011	71	11	60	71	38	74	47	51	76	66
Atilla ve ark. (107)	2012	43.6	46.4	TE	69.1	23.6	64.5	59.1	TE	53.6	33.6
Aktaş ve ark. (108)	2012	10	5	TE	TE	36	21	16	TE	17	14
Uzun ve ark. (109)	2012	18	12	18	23	36	TE	37	TE	51	41
Bizim Çalışmamız	2012	11	13	14	16	16	21	25	26	26	35

* IPM: İmipenem, AK: Amikasin, MEM: Meropenem, GN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, PIP: Piperasilin, CAZ: Seftazidim, LEV: Levofloksasin, FEP: Sefepim, TZP: Piperasilin/tazobaktam. **TE: Test edilmemiş.

Karbapenemler bakteriyel dirençten en az etkilenen beta laktam antibiyotikler olmuştur. Bununla birlikte edinilmiş karbapenemazların çoğunlukla *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* kökenlerinde bazen de *Enterobacteriaceae*'larda giderek artan oranlarda olduğu belirtilmiştir. Ancak bu enzimler hala nadirdir ve kemoterapide yaygın kısıtlamalara yol açmamıştır. Yine de gelecekte daha büyük bir sorun haline gelecekleri düşünülmektedir (110). Bizim çalışmamızda imipenem direnci %11 olarak bulunmuştur. Bu oran Aktaş ve ark. (108)'nın tespit ettiği %10 oranındaki dirence yakın olmasına rağmen Berkaş ve ark. (106)'nın belirttiği %71 oranındaki dirençten çok daha düşüktür. Çalışmamızda tespit ettiğimiz %14 oranındaki meropenem direnci bazı çalışmalarda (95,98,106,109) belirtilen %18-60 arasında değişen oranlardaki dirençten daha düşüktür. Yurtdışında yapılan çalışmalarda imipenem direnci %3.4-42.3 arasında, meropenem direnci de %9.1-45.5 olarak bildirilmiştir (111-115).

P.aeruginosa'da tedavi sırasında çeşitli mekanizmalara bağlı olarak kullanılan antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi diğer bakterilere kıyasla daha fazla olduğundan tek ajanla tedavi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle antipsödomonal antibiyotikler genellikle bir aminoglikozid ile kombine edilerek kullanılırlar. Amikasin, aminoglikozid modifiye edici enzimlerden daha az etkilendiği için *Pseudomonas* dahil Gram negatif bakteri infeksiyonlarında grubunun diğer üyelerine göre daha etkindir (116). Çalışmamızda tespit ettiğimiz %13'lük amikasin direnci, Paköz ve ark. (103) ile Doğan ve ark. (96)'nın bildirdiği amikasin direnç oranı ile aynıdır. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda amikasin direnci %4-46.4 arasında bildirilmiştir (95-109). Gentamisin direnci çalışmamızda %16, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda %14-75 olarak tespit edilmiştir (95-107,109). Bu oranlar amikasinine göre gentamisinin daha dirençli olduğunu göstermektedir. Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda amikasin direnci %6.7-59.1 arasında saptanmıştır (112,114,115). Gentamisin direnci de %12.9-79.7 arasında bildirilmiştir (114,115,117).

Kinolonlar da kombinasyon tedavisinde kullanılabileceği gibi tek başlarına da kullanılabilirler. Kinolonlar içinde grubun diğer üyelerine kıyasla siprofloksasin, *P.aeruginosa* ve diğer hastane kökenli infeksiyonlarda daha etkin bir antibiyotiktir (116). Siprofloksasin direnci çalışmamızda %16, diğer bazı çalışmalarda %13-52

olarak tespit edilmiştir (95,97-102,104-109). Levofloksasin direnci ise çalışmamızda %26, diğer bazı çalışmalarda %31-51 olarak tespit edilmiştir (96,98,101,103,106). Çalışmamıza göre hastanemizdeki levofloksasin direncinin, siprofloksasin direncine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda siprofloksasin direnci %11.3-80.3 arasında saptanmıştır (112,114,115,117).

Seftazidim *P.aeruginosa* infeksiyonlarında ilk tercih edilecek antibiyotiklerden birisidir. Seftazidim direnci çalışmamızda %25, diğer bazı çalışmalarda %16-70 olarak tespit edilmiştir (95-109). Çalışmamızdaki seftazidim direnci, Öztürk ve ark. (97)'nin bildirdiği %23 ile Ağca ve ark. (105)'nin bildirdiği %22 oranlarına yakındır. Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda seftazidim direnci %9.9-45.8 arasında bildirilmiştir (111,112,114,115,117).

Hastane kökenli Gram negatif basil infeksiyonlarında tercih edilecek antibiyotiklerden bir diğeri de sefepimdir. Sefepim, üçüncü kuşak sefalosporinlere kıyasla AmpC tipi kromozomal beta laktamazlara karşı daha stabildir. Bu nedenle *P.aeruginosa*'ya karşı daha etkindir. Sefepim direnci çalışmamızda %26, diğer bazı çalışmalarda %17-87 olarak saptanmıştır (95-100,102-109). Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda sefepim direnci %11.2-48.9 arasında bildirilmiştir (111,114,117).

Piperasilin direnci çalışmamızda %21, diğer bazı çalışmalarda %11-79 olarak saptanmıştır (95,97,101,102,104,106-108). Piperasilin/tazobaktam direnci de çalışmamızda %35, diğer bazı çalışmalarda %8-97 olarak tespit edilmiştir (95,97-99,102-109). Yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda piperasilin direnci %12-86.2 arasında saptanmıştır (111,112,114,115). Piperasilin/tazobaktam direnci de %9-56.8 arasında bildirilmiştir (114,115,117). Çalışmamızda beklenenin aksine piperasilin direncinin piperasilin/tazobaktam direncinden daha az olduğu saptanmıştır. Bunun sebebinin AmpC beta laktamaz indüksiyonunda beta laktamaz inhibitörlerine karşı direncin daha fazla olması olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz direnç oranlarının diğer çalışmalardaki direnç oranlarından genellikle daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun hastanemizin binasına yeni taşınmasından, hastanemizde infeksiyon kontrol programlarının etkin biçimde uygulanmasından ve etken bakterilerin antibiyotik

duyarlılıklarının belirlenerek antibiyotik kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Beta laktam antibiyotiklere direnç ilk beta laktam antibiyotik olan penisilinin geliştirilmesinden önce başlamıştır (4). Gram negatif patojenlerde, beta laktamaz üretimi beta laktam antibiyotik direncine yol açan en önemli mekanizmadır. Tanımlanmış 340 farklı beta laktamaz arasında en önemli enzim gruplarından plazmid kökenli sefalosporinazlar, MBL ve GSBL'lerin sayısı artmaya devam etmektedir (3).

GSBL aracılığı ile geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç dünyada giderek artan bir sağlık sorunudur (71). GSBL üreten Gram negatif organizmalar 1980'lerden beri nozokomiyal infeksiyonların önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir (118). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ÇDST yöntemiyle GSBL varlığını Şahin ve ark. (119) 18 *P.aeruginosa* kökeninin %16.7'sinde, Güler ve ark. (120) 332 *Pseudomonas* spp. kökeninin dokuzunda, Öztürk ve ark. (97) 97 *P.aeruginosa* kökeninin beşinde, Gençer ve ark. (121) 99 *P.aeruginosa* kökeninin dördünde, Çeliksöz ve ark. (122) 70 *P.aeruginosa* kökeninin %50'sinde, Yücesoy-Dede B. (44) 172 *P.aeruginosa* kökeninin %5'inde, Çelik N. (123) 50 *P.aeruginosa* kökeninin %18'inde pozitif olarak saptamışlardır. E-test yöntemiyle Gazi ve ark. (124) 108 *P.aeruginosa* kökeninin % 9.4'ünde, Çelen ve ark. (125) 39 *Pseudomonas* spp. kökeninin %33'ünde, Geyik ve ark. (126) 24 *Pseudomonas* spp. kökeninin %13'ünde GSBL varlığını pozitif olarak bulmuşlardır. Yine ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda Güven ve ark. (127) 161 *P.aeruginosa* kökeninin %1.2'sinde, Gönüllü ve ark. (128) 50 *P.aeruginosa* kökeninin %16'ında GSBL varlığını pozitif olarak saptamışlardır. Köroğlu ve ark. (129) çeşitli yöntemler kullanarak yaptıkları bir çalışmada 33 *Pseudomonas* spp. kökeninde GSBL pozitifliği saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz %4'lük GSBL pozitifliğinin diğer çalışmalardaki bazı GSBL oranları ile uyumlu olmasına rağmen bazılarında da düşük olduğu tespit edildi. Bunun sebebinin çalışmalarda kullanılan yöntemlerin çeşitliliği, hasta profillerinin bölgesel farklılıkları ve yüksek düzeyde AmpC beta laktamaz varlığının GSBL tanımlamayı maskeleyebileceği düşünüldü. Yurtdışında *P.aeruginosa* kökenlerinde yapılan çalışmalarda Mathur ve ark. (130) GSBL pozitifliğini % 64 olarak bulmuşlardır.

Aggarwal ve ark. (131) 148 kökeni inceledikleri bir çalışmada ÇDST yöntemiyle %20.3 oranında GSBL pozitifliği saptamışlardır. Aynı yöntemi kullanan Wolska ve ark. (45) 66 *P.aeruginosa* kökeninde GSBL varlığı saptamamışlardır. Umadevi ve ark. (132) çift disk yaklaştırma yöntemi ve kombine disk yöntemini kullanarak 27 *Pseudomonas* spp. kökeninde %14 oranında GSBL pozitifliği tespit etmişlerdir. Vahdani ve ark. (133) *P.aeruginosa* kökenlerinde yaptıkları bir çalışmada kombine disk yöntemi ile %18 oranında GSBL varlığı saptamışlardır.

Karbapenem hidrolize eden beta laktamazların dünya çapında yayılmasının yakın gelecekte antibiyotik etkinliği için önemli bir tehdit olacağı düşünülmektedir (134). Karbapenemazlar içinde en sık saptanan enzimler MBL'lerdir. MBL'ler özellikle *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ve son yıllarda da *Enterobacteriaceae* üyelerinde olmak üzere bütün dünyada yaygın olarak izole edilmektedir (135). MBL'ler yakın zamanlarda beta laktam hidrolize eden enzimler arasında daha belirgin hale gelmiştir. Karbapenemlerin yanı sıra çoğu beta laktam antibiyotiği de hidroliz edebilme kapasitelerinden dolayı MBL'leri üreten bakteriler söz konusu olduğunda beta laktam antibiyotiklerin kullanılabilirliği ciddi olarak sınırlanmış durumdadır (136). Geniş spektrumlu direnç profili sergilemeleri MBL üreten kökenlerin tedavisindeki en önemli sorundur (61). Çalışmamızda tespit ettiğimiz MBL pozitif köken; sadece aztreonama duyarlı iken amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, seftazidim, sefepim, imipenem, meropenem, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam dirençli olarak saptanmıştı. Ülkemizde E-test yöntemiyle yapılan çalışmalarda Öztürk ve ark. (97) 97 *P.aeruginosa* kökeninde 22 imipenem dirençli köken saptamışlar ancak hiçbir kökende MBL saptamamışlardır. Yine Öztürk ve ark.'nın başka bir çalışmasında (102) 100 *P.aeruginosa* kökeni incelenmiş ve imipenem dirençli 18 kökenin beşinde (%28) MBL varlığı tespit edilmiştir. Aktaş ve ark. (58) 56 *P.aeruginosa* suşunun 19'unda imipenem direnci belirlemiş ve bu kökenlerden altısında (%31.5) MBL üretimi saptamışlardır. Aşçı-Toraman ve ark. (137) 407 *Pseudomonas* kökeninde yaptıkları bir çalışmada 42 kökende karbapenem direnci saptamışlar, bu dirençli kökenler içinde de 10 (%24) kökende MBL tespit etmişlerdir. Bayraktar ve ark. (59) karbapenem dirençli 27 *P.aeruginosa* kökeninde yaptıkları bir çalışmada 17 (%66.6) kökende MBL saptamışlardır. Sesli-Çetin ve ark. (138) ise hem E-test

yöntemini hem de kombine disk, ÇDST ve modifiye Hodge yöntemlerini kullanarak 189 *P.aeruginosa* kökeninde yaptıkları çalışmada; imipeneme dirençli bulunan 52 *P.aeruginosa* kökeninde MBL üretimini araştırmışlardır. İmipeneme dirençli kökenlerde MBL üretimini E-test ile %40, kombine disk yöntemi ile %62, IMP-EDTA ÇDST ile %73, modifiye Hodge testi ile %58 oranında bulmuşlardır. *P.aeruginosa* kökenlerinden ise %21.2'sinin dört farklı fenotipik yöntemle de MBL pozitifliği gösterdiğini saptanmışlardır. Arabacı ve Oldacay (99) 108 *P.aeruginosa* kökeninde yaptıkları bir çalışmada 20 kökende imipenem direnci saptamışlar ve bu imipenem dirençli kökenlerin 14'ünde (%70) ÇDST ile MBL'yi pozitif olarak bildirmişlerdir. Gayyurhan ve ark. (60) 89 *P.aeruginosa* kökeninin 18'inde imipenem direnci belirlemiş ve IPM-EDTA disk testi kullanarak bunların 13'ünde (%72.2) MBL pozitifliği bildirmişlerdir. Fidan ve ark. (139) çalıştıkları 40 *P.aeruginosa* kökeninin ikisinde (%5) hem Modifiye Hodge testi, hem ÇDST ile MBL varlığı tespit etmişlerdir. Gençer ve ark. (121) çalıştıkları 99 *P.aeruginosa* kökeninde modifiye Hodge testi ile hiçbir kökende MBL saptamamışlardır. Yurtdışında yapılan çalışmalarda Mendiratta ve ark. (140) 174 kökeni inceledikleri çalışmalarında 15 (%8.6) *P.aeruginosa* kökeninin imipeneme ve seftazidime dirençli olduğunu, ÇDST ile bu kökenlerden 14'ünün MBL ürettiğini tespit ederken, Khosravi ve ark. (141) 100 *P.aeruginosa* kökeninin 41'inde imipenem direnci saptamışlar ve E-test yöntemi ile bu kökenlerin sekizinde (%19.5) MBL üretimi bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda sadece bir (%1) köken MBL pozitif olduğu için MBL'lerin antibiyotik duyarlılıkları üzerindeki etkileri değerlendirilememekle birlikte bu tek köken imipenem ve meropeneme dirençli aztreonama duyarlı olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere tüm bu çalışmalardaki MBL pozitifliği oranlarının geniş bir aralıkta dağıldığı görülmektedir. Bunun sebebinin çalışmalardaki hasta sayıları ve yöntem farklılıkları ile hastanelerdeki hasta kapasitelerinin ve kullanılan antibiyotik kısıtlama programlarının farklılığı olduğu düşünülmüştür.

Kromozomal indüklenen beta laktamazlar, AmpC beta laktamazlar veya sefalosporinazlar olarak da adlandırılırlar. Bu enzimler *Enterobacteriaceae* ailesinin çoğu türü gibi *P.aeruginosa* tarafından da üretilir (19,26,142). Uygun antibiyotik tedavisi ve infeksiyon kontrol politikaları için AmpC beta laktamazların saptanması

önemlidir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda Çelik ve ark. (43) 50 *P.aeruginosa* kökeninin %82'sinde, Özgenç ve ark. (40) 199 *P.aeruginosa* kökeninin %77'sinde, Ekşi ve ark. (41) 51 *P.aeruginosa* kökeninin %52.9'unda, Yücesoy-Dede B. (44) 172 *P.aeruginosa* kökeninin %40'ında, Berктаş ve ark. (106) 87 *P.aeruginosa* kökeninin %74'ünde, Çelik N. (123) 50 *P.aeruginosa* kökeninin %32'sinde, Öztürkeri ve ark. (143) 43 *P.aeruginosa* kökeninin %35'inde, Gençler ve ark. (121) 65 *P.aeruginosa* kökeninin %53'ünde, Özyurt ve ark. (144) 350 *Pseudomonas* spp. kökeninin %61.1'inde, Küçükateş ve ark. (42) 79 *P.aeruginosa* kökeninin %40.5'inde İBL pozitifliği saptamışlardır. Yurtdışından ise Wolska ve ark. (45) 66 *P.aeruginosa* kökeninin %98.5'inde İBL varlığı bildirmişlerdir. Dunne ve Hardin (145) 134 *P.aeruginosa* kökeninin %85.8'inde İBL ve %11.2'inde dereprese mutant köken varlığı saptamışlardır. Liu ve ark. (146) yaptıkları bir çalışmada 170 *P.aeruginosa* kökeninin ikisini dereprese mutant olarak saptamışlardır. Çalışmamızda DİT yöntemiyle saptadığımız %73'lük İBL oranı Çelik ve ark. (43), Özgenç ve ark. (40) ile Berктаş ve ark. (106)'nın tespit ettiği oranlara yakın, ülkemizde yapılan diğer bazı çalışmalarda tespit edilen oranlara kıyasla daha yüksektir. Yine çalışmamızda tespit ettiğimiz geniş spektrumlu sefalosporinlere, aztreonama, sefoksitine dirençli, imipeneme duyarlı %8'lik stabil dereprese mutant köken oranı, Dunne ve Hardin (145)'nin bildirdiği orana yakın, Liu ve ark. (146)'nın bildirdiği orandan yüksektir.

AmpC beta laktamazlar, sefalosporinlere ve benzil penisiline etkilidir (26). Düşük düzeyde üretilen enzim sefalosporinlere ve aminopenisilinlere karşı dirence yol açar (38). İndüksiyonu sonucunda aminopenisilinlere, beta laktamaz inhibitörlerine ve birinci kuşak sefalosporinlere direnç; karboksipenisilinler, üreidopenisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler, aztreonam, sefepim, sefpirom ve karbapenemlere duyarlılık görülür (26). İndüklenebilir AmpC beta laktamaz üreten kökenlerle oluşan infeksiyonlarda antibiyogram sonucu üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı olarak bulunsa da tedavi sırasında direnç gelişebilmektedir.

Çalışmamızda DİT ile AmpC beta laktamaz pozitif olan kökenlerden 60'mın seftazidime duyarlı olduğu saptanmış olsa da direnç gelişebileceği akılda tutulmalıdır. Çalışmamızda DİT ile AmpC beta laktamaz pozitif olan kökenlerden 62'si piperasiline duyarlı bulunurken, 51'i piperasilin/tazobaktama duyarlı bulunmuştur. Bunun sebebi AmpC beta laktamaz indüksiyonunda beta laktamaz

inhibitörlerine karşı direncin daha fazla olmasıdır. AmpC beta laktamaz indüksiyonunda karbapenemlere duyarlılık görülür. Çalışmamızda DİT ile AmpC beta laktamaz pozitif olan kökenlerden 70 köken imipeneme, 69 köken ise meropeneme duyarlı olarak bulunmuştur. DİT ile AmpC beta laktamaz pozitif olarak bulunan 73 kökenin 60'ının aztreonama duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda PZR yöntemiyle 96 (%96) kökenin *AmpC* geni taşıdığı tespit edilmiştir. Önceki yıllarda Özer ve ark. (147) hastanemizin yoğun bakım ünitesinden izole ettikleri *P.aeruginosa* kökenlerinde yaptıkları çalışmada *AmpC* geni oranını %42 olarak bulmuşlardır. Bu iki çalışma karşılaştırıldığında hastanemizdeki *AmpC* geni oranının yıllar içinde arttığı görülmektedir. Çalışmamızda PZR ile *AmpC* geni taşıdığı tespit edilen kökenlerden 73 kökende DİT ile de AmpC beta laktamaz varlığı pozitif olarak bulunmuş olup 23 kökende ise *AmpC* geni pozitif olmasına rağmen DİT ile AmpC beta laktamaz varlığı saptanamamıştır. Bu da geni taşımasına rağmen genin eksprese olmadığını göstermektedir. *AmpC* geninin kromozomal olduğu kadar artık plazmid ile de taşınabildiği bilinmektedir. Eksprese olmasa da *AmpC* geni taşıyan kökenlerden diğer kökenlere hızla yayılabilmektedir. Bu sebeple AmpC beta laktamaz, GSBL, MBL gibi enzimleri üreten bakterileri kökenlerinin takibi, tedavi ve bu kökenlerle gelişen infeksiyonların önlenmesinde önemlidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinde GSBL, MBL ve AmpC tipi beta laktamaz araştırılması, *AmpC* geninin saptanması amaçlanmıştır.

Klinik örneklerden izole edilen 100 *P.aeruginosa* kökeninin antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 otomatize sistemi ile belirlenmiştir. GSBL varlığı CAZ/CZC KDDT yöntemiyle, MBL varlığı E-test yöntemiyle, AmpC beta laktamaz varlığı DİT yöntemiyle ve genotipik olarak *AmpC* geni varlığı PZR yöntemiyle saptanmıştır.

Çalışmamızdaki kökenlerin en duyarlı olduğu antibiyotiğin imipenem olduğu saptanmıştır. Duyarlı olan diğer antibiyotikler amikasin, meropenem, gentamisin ve siprofloksasin'dir. Kökenlerin en dirençli olduğu antibiyotikler ise piperasilin/tazobaktam, sefepim, levofloksasin, seftazidim ve piperasilin olarak saptanmıştır. Çalışmamızdaki antibiyotik direnç oranları ülkemizdeki bazı çalışmalarda tespit edilen oranlardan nispeten düşük olmasına rağmen hastanemizde zamanla artan oranlarda direnç gelişebileceği unutulmamalıdır.

Çalışmamızda CAZ/CZC KDDT ile dört (%4) köken GSBL pozitif olarak belirlenmiş olup bu oran ülkemizde yapılan diğer çalışmalardaki oranlardan düşüktür. Bu düşüklüğün çeşitli sebepleri olabileceği gibi en önemli sebebinin yüksek düzeyde AmpC beta laktamaz varlığının GSBL tanımlamayı maskeleymesi olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda tespit ettiğimiz yüksek düzeydeki AmpC beta laktamaz varlığı bu düşüncemizi desteklemektedir. Bundan dolayı AmpC beta

laktamaz enzimini baskılayan boronik asit, kloksasilin gibi ajanlar kullanılarak GSBL varlığının daha iyi ortaya çıkarılabileceği ileri yöntemlerle daha doğru sonuçlar elde edileceği kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda sadece bir (%1) kökende MBL saptanmıştır. MBL'ler aztreonam dışındaki beta laktam antibiyotiklere direnç oluşumunun önemli nedenlerden biridir. Günümüzde MBL rutin olarak tespit edilmemektedir ve karbapenem dirençli kökenlerde dikkatli olmak gerekmektedir. Bu yüzden bu enzimlerin epidemiyolojik açıdan tanımlanarak direnç yayılımının kontrol edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda DİT yöntemiyle örneklerin 73 (%73)'ünde AmpC tipi beta laktamaz pozitif olarak saptanmıştır. AmpC beta laktamaz pozitif olan kökenlerden 60'nın seftazidim ve yine 60'nın sefepime duyarlı oldukları tespit edilmiştir. AmpC beta laktamaz üreten kökenlerle oluşan infeksiyonlarda 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı olsalar bile tedavi sırasında direnç gelişebileceği ve tedaviye cevap alınamayacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda DİT yöntemiyle AmpC beta laktamaz ürettiğini saptadığımız kökenlerden 62'si piperasiline duyarlı bulunurken, 51 kökenin piperasilin/tazobaktama duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum AmpC beta laktamaz enzim indüksiyonunda beta laktamaz inhibitörlerine karşı direncin daha fazla olmasına bağlanmıştır. Yine DİT yöntemiyle AmpC beta laktamaz ürettiğini saptadığımız kökenlerden 69'u meropeneme, 70'i imipeneme ve 60'ı da aztreonama duyarlı olarak bulunmuş olup bu sonuçlar Amp C beta laktamaz etkileri ile uyumludur.

Çalışmamızda PZR yöntemiyle kökenlerin %96'sında *AmpC* geni tespit edilmiş olup bu kökenlerin 73'ünün DİT yöntemiyle AmpC beta laktamaz ürettiği saptanmıştır. Kökenlerin 23'ünde *AmpC* geni saptanmasına rağmen DİT yöntemiyle AmpC beta laktamaz üretmediği saptanmıştır. Bu durum *AmpC* geni taşıyan bazı kökenlerin henüz AmpC beta laktamaz üretmediği ve hastanemizde AmpC beta laktamaz üreten *P.aeruginosa* kökenlerinin oranında zamanla artış olabileceği anlamına gelmektedir.

Antibiyotik direnci tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmaları bilinmeli ve direnç gelişimi

önlenmelidir. Beta laktamazların ve bu beta laktamazları kodlayan genleri taşıyan kökenlerin saptanması infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, infeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve infeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Çeşitli Gram-Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının İki Yöntemle Araştırılması; Klimik Derg. 2004; 17(1): 47-9.
2. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(5): 1681-8.
3. Bush K. New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001;32: 1085-9.
4. Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 933-51.
5. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta lactamases. Eur J Clin Microbial Infect Dis. 1994; 13(1): 17-29.
6. Livermore DM, Williams JD. Antibiotics in Laboratory Medicine. β -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance, fourth edition, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, s. 502-78.
7. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora. 1997; 3(Ek-1): 1-16.

8. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Béb ar C, Quantin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteria* in a French hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16: 523-9.
9. Procop GW, Tuohy MJ, Wilson DA, Williams D, Hadziyannis E, Hall GS. Cross-class resistance to non-beta-lactam antimicrobials in extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Clin Pathol.* 2003; 120(2): 265-7.
10. Pool K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(17): 2200-23.
11. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;3: 489-95.
12. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8: 321-31.
13. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22: 582-610.
14. Şener B. "Klinik Mikrobiyoloji" kitabında *Pseudomonas*, 9.Baskı. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology.*  eviri editörü: BaŐustaoĐlu A, Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009. Sayfa: 734-48.
15. Erdem B. "Temel ve Klinik Mikrobiyoloji" kitabında *Pseudomonaslar*. Editör: Ustaçelebi Ő, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 1999. Sayfa: 551-8.
16. Bilgehan H. "Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları" kitabında Non-Fermentatif Gram Olumsuz Basiller, 10. Baskı. İzmir: BarıŐ Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2000. Sayfa: 175-97.
17. Gessard C. Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Rev Infect Dis.* 1984;6: 775-6.

18. Freeman L. Chronic general infection with the *Bacillus pyocyaneus*. Ann Surg. 1916;64: 195–202.
19. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009;58: 1133–48.
20. Livermore DM. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8: 557–84.
21. Kohler T, Epp SF, Curty LK, Pechère JC. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1999;181: 6300–5.
22. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother. 2002;50: 11–8.
23. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47: 247–50.
24. Akova M. “Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları” kitabında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi, 2. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012. Sayfa: 79-90.
25. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis. 1997;24: 19-45.
26. Gülay Z. “Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları” kitabında İndüklenebilir Beta Laktamazlar, 2. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012. Sayfa: 91-110.
27. Gülay Z. “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji” kitabında Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. Editör: Ustaçelebi Ş, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 1999. Sayfa: 91-108.
28. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980;289(1036): 321-31.

29. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6): 1211–33.
30. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 969-76.
31. Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszanska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* -a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(2): 137-42.
32. Abraham EP, and Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940;146:837.
33. Eriksson-Grennberg KG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. II. An improved mapping of the ampA gene. *Genet Res.* 1968;12: 147–56.
34. Eriksson-Grennberg KG, Boman HG, Jansson JA and Thorén S. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. I. Genetic study of some ampicillin-resistant mutants. *J Bacteriol.* 1965;90: 54–62.
35. Linström EB, Boman HG, and Steele BB. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. *J Bacteriol.* 1970;101: 218–31.
36. Jaurin B and Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78: 4897–901.
37. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae.* *Am J Infect Control.* 2006;34: 20-8.
38. Langae TY, Gagnon L and Huletsky A. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44: 583–9.

39. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M and Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3406–11.
40. Özgenç O, Urbarlı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 2002;16: 179-82.
41. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2007;37: 142-6.
42. Küçükateş E, Kansız E, Gültekin N. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda indüklenebilir beta-laktamazların araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2007;37(3): 138-41.
43. Çelik İ, Cihangiroğlu M, Akbulut A. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta laktamaz sıklığı. *Fırat Tıp Derg.* 2007; 12: 284-6.
44. Yücesoy Dede B. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006.
45. Wolska K, Jakubczak A, Soszyńska A. Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL, IBL and MBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Med Dosw Mikrobiol.* 2008;60(2): 111-9.
46. Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A. Occurrence of Beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. *Med. Dosw Microbiol.* 2001;53: 45–51.
47. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34: 2200–9.
48. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can J Microbiol.* 2002;48: 479-93.

49. Hall LM , Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE . OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37: 1637–44.
50. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, Mc Clure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 3129-35.
51. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3): 440-58.
52. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(1): 147-51.
53. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43: 1584–90.
54. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11: 2-9.
55. Midilli K, Aygün G, Kuşkuçcu M, Yaşar H, Ergin S, Altaş K. Bir *Klebsiella pneumoniae* kökeninde saptanan yeni bir metalo beta laktamaz varyantı: VIM-5. *Klimik Dergisi*, Cilt 16 (Özel Sayı:1 Mart 2003): Sayfa 275.
56. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54: 282-3.
57. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12): 5046-54.
58. Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta laktamaz üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 2009;23(2): 57–62.

59. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Metallobetalaktamaz Üretiminin Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2004;34: 248-52.
60. Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz oranlarının belirlenmesi. İnfeksiyon Derg. 2008;22(1): 49-52.
61. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?. Clin Microbiol Rev. 2005;18: 306-25.
62. Markou N, Apostolakis H, Koumoudiou C, Athanasiou M, Koutsoukou A, Alamanos I and Gregorakos L. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. Crit Care 2003;7(5): 78–83.
63. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2): 479–87.
64. Gülay Z. “Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (ESBL)” kitabında ESBL’lerin Tanı Yöntemleri. Konuk Editör: Köksal İ, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. Sayfa: 13-25.
65. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22. Wayne, PA. 2012, CLSI.
66. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Review. 2001;14: 933-51.
67. M’Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D and Hawkey PM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. J Antimicrob Chemother. 2000;45(6): 881–5.

68. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 1998;42(1): 49–54.
69. Casals JB, Pringler N. Detection in the routine laboratory of new plasmid mediated broad spectrum beta lactamases in *Enterobacteriaceae*. In Proceedings of the 7th Mediterranean Congress of Chemotherapy. Barcelona, Spain, 1990.
70. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(9): 1877–82.
71. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol*. 1996;34(8): 1880–4.
72. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol*. 1997;35(9): 2191–7.
73. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knapp C, Mulder R. Detection of extended spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol*. 1996;34(12): 2997–3001.
74. Ouellette M, Paul GC, Philippon AM, Roy PH. Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in beta-lactamase characterization of 114 resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(3): 397–9.
75. Gür D. Genişlemiş Spektrumlu (ESBL) ve Plazmid Kaynaklı AmpC β -Laktamazlar. *Klinik Dergisi*, Cilt 18 (Özel Sayı 1: Kasım 2005): 147-51.
76. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7(2): 88-91.

77. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA Double-Disk-Synergy test for metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003;41(10): 4623–9.
78. Topçu Albayrak G. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde Çift Disk Sinerji Testi ve Kombine Çift Disk Sinerji ile Metallo Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
79. Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Gales A. Evaluation of a new E test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol. 2002;40(8): 2755–9.
80. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(1): 5-11.
81. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM and Pagani L. Simple Microdilution Test for Detection of Metallo- β -Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2002;40: 4388-90.
82. Sarı H. Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/ meropenem EDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge test ile metallo-beta-laktamaz (MBL) varlığının araştırılması. Kartal Dr.Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2005.
83. Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. Toraks Dergisi. 2002;3(1): 75-88.
84. Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. Problems with detection of beta-lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. Infect Dis Clin North Am. 1993;7(2): 411-24.
85. Sanders CC, Sanders WE Jr. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis. 1992;15(5): 824-39.

86. Livermore DM. β -lactamases: Quantity and resistance. Clin Microbiol Infect. 1997;3: 10-9.
87. Balıkcı A. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* cinsi bakterilerde plazmidik AmpC tipi beta laktamaz direnci. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007.
88. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol Lett. 2006;254(2): 217–25.
89. Decre D, Burghoffer B, Gautier V, Petit JC, Arlet G. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2004;54(5): 881-8.
90. Demirbakan H, Midilli K, Ögünç D, Özen N, Öngüt G, Dağlar D, Mutlu D, Özhak B, Çolak D. Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı saptanan *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzim tiplerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2008;42: 545-51.
91. Özdemir M, Erayman İ, Türk Dağı H, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Ankem Derg. 2009; 23(3):122-6.
92. Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif nonfermentatif basiller ve antibiyotiklere direnç sorunu. Hastane İnfeksiyon Derg. 1999;3: 33-9.
93. Kireççi E, Sevinç İ. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. Ankem Derg. 2008;22: 209-12.
94. Ersöz G, Otağ F, Bayındır İ, Kandemir Ö, Aslan G, Kaya A. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri. Ankem Derg. 2004;18: 28-31.

95. Özer B, Tatman-Otkun M, Memiş D, Otkun M. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkenleri, antibiyotik duyarlılıkları ve antibiyotik kullanımı. *İnfeksiyon Derg.* 2006;20(3): 165-70.
96. Doğan SŞ, Paköz NİE, Aral M. Laboratuvarımıza Gönderilen Yara Yeri Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotiklere Direnç Durumları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010;40 (4): 243-9.
97. Öztürk CE, Türkmen Albayrak H, Altınöz A, Ankaralı H. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotiklere Direnç ve Beta-Laktamaz Oranları. *Ankem Derg.* 2010;24(3): 117-23.
98. Aktepe OC, Aşık G, Çetinkaya Z, Çiftçi İH, Altındiş M. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010;40: 225-31.
99. Arabacı F, Oldacay M. Yoğun Bakım Servisinde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010;40 (1): 37 – 40.
100. Üstün C. Hastane kökenli karbapenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. *Ankem Derg.* 2010;24(1): 1-6.
101. Berктаş M, Çıkman A, Parlak M, Yaman G, Güdücüoğlu H. Nozokomiyal Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotiklere Direnç. *Van Tıp Derg.* 2011;18 (4): 192-6.
102. Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg.* 2011;25(1): 42-7.
103. Paköz NİE, Şeriban Doğan S, Aral M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg.* 2011;25(2):73-8.
104. Türk Dağı H, Arslan U, Fındık D, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *Ankem Derg.* 2011;25(2): 107-10.

105. Ağca H. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2011;41(3): 107-10.
106. Berktaş M, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Yaman G. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında İndüklenebilir Beta-Laktamaz Aktivitesi. Fırat Tıp Derg. 2011;16(3): 125-8.
107. Atilla A, Eroğlu C, Esen Ş, Sünbül M, Leblebicioğlu H. Hastane Kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında PER-1 Tipi Beta-Laktamaz Sıklığının ve Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2012;46(1): 1-8.
108. Aktaş Z, Satana D, Kayacan Ç, Can B, Gönüllü N, Küçükbasmacı Ö. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Oranları ve Beta-Laktam Direnç Mekanizmalarının Tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2012;46(3): 386-97.
109. Uzun B, Güngör S, Yurtsever SG, Afşar İ, Demirci M. Yoğun Bakım Hastalarının Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Durumları. Ankem Derg. 2012;26(2): 55-60.
110. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs. 2002;3(2): 218-24.
111. Ishii Y, Alba J, Kimura S, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics by Etest against clinical isolates from 100 medical centers in Japan (2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;55(2): 143-8.
112. Bonfiglio G, Carciotto V, Russo G, Stefani S, Schito GC, Debbia E and Nicoletti G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. J Antimicrob Chemother. 1998;41(2): 307-10.
113. Falagas ME, Bakossi A, Pappas VD, Holevas PV, Bouras A, Stamata E. Secular trends of blood isolates in patients from a rural area population hospitalized in a tertiary center in a small city in Greece. BMC Microbiol. 2006;6: 41.

114. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol.* 2007;56: 956-63.
115. Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007;40(1): 45-9.
116. Şener AG, Atay T, Gülay Z, Türker M. Çoklu dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde siprofloksasin-amikasin, siprofloksasin-sefepim, seftazidim-amikasin, sefepim-amikasin kombinasyonlarının in-vitro sinerjistik etkinliklerinin araştırılması. *Ankem Derg.* 2003;17(4): 388-92.
117. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3: 7.
118. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with bla_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis.* 2004;38(12): 1736-41.
119. Şahin İ, Kaya D, Öksüz Ş, Okay A, Şencan İ, Öztürk E. Klinik örneklerden izole edilen Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi.* 2003;17(1): 45-8.
120. Güler Ö, Aktaş O, Uslu H. Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilerde Beta-Laktamaz Varlığının ve Çeşitli Antibiyotik Gruplarına Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. *Ankem Derg.* 2008;22(2): 72-80.
121. Gençer S, Ak Ö, Benzonana N, Batirel A, Özer S. Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2002;1: 2.
122. Çeliksöz C, Karslıgil T, Balcı İ. Seftazidim Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı. *Gaziantep Tıp Derg.* 2009;15(1): 20-3.

123. Çelik N, Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta laktamazların incelenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2008;38(1): 5-11.
124. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Ünlü Kan E, Özbakkaloğlu B. Hastane Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç. Hastane Enfeksiyonları Dergisi. 2004;8: 299-303.
125. Çelen MK, Ayaz C, Geyik MF, Hoşoğlu S, Uluğ M. Hastane kökenli Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankem Derg. 2006;20(3): 148-51.
126. Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Uçmak H, Çelen MK, Hoşoğlu S, Ayaz C. Hastane kaynaklı Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Enfeksiyon Derg. 2002;16(2): 175-8.
127. Güven Ö, Ünver D, Özdemir S, Gönüllü N, Küçükbasmacı Ö, Altaş K. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2008;38 (3-4) : 112-6.
128. Gönüllü N, Gürol Y, Bülüş M, Bal Ç. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Görülen Beta-Laktam Direnç Fenotipleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Hastane Enfeksiyonları Dergisi. 2003;7: 141-7.
129. Köroğlu M, Tekerekoğlu MS, Durmaz B, Durmaz R. Gram Negatif Çomaklarda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlığını Saptamada Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması. Ankem Derg. 2001;15: 46-52.
130. Mathur P, Kapil A, Das B, Dhawan B. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacteria in a tertiary care hospital. Indian J Med Res. 2002;115: 153-7.
131. Aggarwal R, Chaudhary U, Bala K. Detection of extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Pathol Microbiol. 2008;51(2): 222-4.
132. Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, Kumar S, Easow JM, Stephen S, Singh UK. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing Gram negative bacilli. J Clin Diag Res. 2011;5(2): 236-9.

133. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012;25(2): 78-81.
134. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3(2): 117-27.
135. Dizbay M. “Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları” kitabında Karbapenemazlar, 2. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012. Sayfa: 111-26.
136. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*. 1998;27: 48-53.
137. Aşçı-Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo beta-laktamaz araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2005;19(1): 101-5.
138. Sesli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Arıdoğan B. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2009;23(2): 51-5.
139. Fidan I, Çetin Gürel F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg*. 2005; 19(2): 68-70.
140. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res*. 2005; 121(5): 701-3.
141. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60(1): 125-8.
142. Vahaboğlu H. Beta-laktamazlar ve Hastane İnfeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 1998;2: 147-9.

143. Öztürkeri H, Kocabeyođlu Ö, Koşan E, Diler M, Özcan Ş. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında sefoksitin ile beta-laktamaz indüksiyonu. *Ankem Derg.* 1997;11(4): 429-31.
144. Özyurt M, Haznedarođlu T, Baylan O, Hoşbul T, Ardiç N, Bektöre B. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotik direnci. *Ankem Derg.* 2010;24(3): 124-9.
145. Dunne WM, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. *Citrobacter* spp. and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12): 5945-9.
146. Liu PY, Gur D, Hall LM, Livermore DM. Survey of the prevalence of beta-lactamases amongst 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30(4): 429-47.
147. Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. *J Antibiot.* 2012;65(1): 9-13.

9. ÖZGEÇMİŞ

Özgür PAŞA, 1977 yılında Hatay'da doğdu. 1997'de Samandağ Lisesi'ni, 2006 yılında ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni bitirdi. 2006 yılında başladığı askerlik hizmetini 2007 yılında tamamladı. 2008 yılında araştırma görevlisi olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladı ve 2013 yılında uzmanlık eğitimini tamamladı.