

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**METALLO BETA LAKTAMAZ ÜRETEN KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa*  
İZOLATLARININ EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Yeşim BEŞLİ**

**TRABZON - 2013**

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**METALLO BETA LAKTAMAZ ÜRETEN KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa*  
İZOLATLARININ EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Yeşim BEŞLİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU**

**TRABZON - 2013**

Çok kıymetli  
annem Perihan ve babam Muammer BEŞLİ'ye

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na anlayışı ve sabrı için; her kapısını çaldığımızda bilgi, deneyim ve yardımlarını bizlerden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kurtuluş BURUK'a sabırlı, hoşgörülü ve samimi yaklaşımları için; yaptığı her iş gibi bizleri ve eğitimimizi de önemseyen Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya nezaketi ve özverisi için; eğitimimiz boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Doç. Dr. İlknur TOSUN'a ve Murat ERTÜRK'e; tanıma şerefine ancak nail olabildiğim Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a; kendisinden gerek akademik gerekse sosyal anlamda pek çok şey öğrenme fırsatı bulduğum anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Faruk AYDIN'a babacan tavırlarıyla bizleri sahiplendiği için; teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sürecinde katkı ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Gamze ÇAN'a, Prof. Dr. Murat TOPBAŞ'a ve Arş. Gör. Dr. Bekir BULUT'a teşekkür ederim.

Tıp eğitimi hayatımın ilk yıllarından beri her konuda desteğini hissettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Çiçek HOCAOĞLU'na ve ailesine, tanımdan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Bio. Gülşen ULUÇAM'a, Arş. Gör. Bio. Ahu REİS'e, Arş. Gör. Dr. Hikmet ÖZTEL OCAK'a, Arş. Gör. Dr. Çiğdem GENÇOĞLU ÖZGÜR'e her zaman yanımda oldukları için; işini seyerek ve heyecanla yapan kıdemli Uzm. Dr. Uğur DİNÇ'e ise eğitimime olan katkıları için teşekkür ederim. Birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve adlarını sayamadığım değerli doktor ve asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalımız hasta hizmetleri laboratuvarının sevgili çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Yeşim BEŞLİ  
Trabzon, 2013

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	3
2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi.....	3
2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.1.3. Virulans Faktörleri .....	6
2.1.3.1. Flajella ve Adhezinler .....	6
2.1.3.2. Lipopolisakkarid.....	7
2.1.3.3. Ekstraselüler Polisakkaridler .....	8
2.1.3.4. Ekzotoksinler.....	8
2.1.3.5. Proteazlar.....	8
2.1.3.6. Hemolizinler.....	9
2.1.3.7. Sideroforlar.....	9
2.1.3.8. Piyosiyenin ve Piyoverdin.....	9
2.1.3.9. Quorum Sensing.....	10
2.1.3.10. Diğer Virulans Faktörleri .....	10
2.1.4. Epidemiyoloji .....	10
2.1.5. Enfeksiyonları .....	11
2.1.5.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları.....	11
2.1.5.2. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları .....	12
2.1.5.3. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları .....	12
2.1.5.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları .....	13
2.1.5.5. Kulak Enfeksiyonları.....	13
2.1.5.6. Göz Enfeksiyonları.....	13

2.1.5.7. Bakteriyemi ve Endokardit.....	13
2.1.5.8. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları .....	14
2.1.6. Laboratuvar Tanısı .....	14
2.1.6.1. Örnek Alınması Taşınması ve Saklanması.....	14
2.1.7.2. Mikroskopik İnceleme.....	14
2.1.7.3. Kültür ve Tanımlama .....	14
2.1.7.4. Tiplendirme Yöntemleri .....	15
2.1.8. Enfeksiyonlarının Tedavisi .....	16
2.1.9. Antimikrobiyal Direnç .....	17
2.1.9.1. Aminoglikozidlere Direnç Mekanizmaları.....	17
2.1.9.2. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları.....	18
2.1.9.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	18
2.1.9.3.1. Aktif Efluks Sistemi ve Dış Memran Geçirgenliğinde Azalma .....	20
2.1.9.3.2. Beta Laktamların Hedeflerinde Değişiklik.....	21
2.1.9.3.3. Beta Laktamazlar .....	21
2.1.9.3.3.1. AmpC Beta Laktamaz.....	23
2.1.9.3.3.2. Sınıf A Karbenisilin Hidrolize Eden Beta Laktamazlar .....	23
2.1.9.3.3.3. Sınıf A Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar.....	23
2.1.9.3.3.4. Sınıf D Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (Oksasilinazlar) .....	24
2.1.9.3.3.5. Karbepenemazlar .....	25
2.2. Metallo Beta Laktamazlar .....	26
2.2.1. Sınıflandırma.....	26
2.2.2. Genetik Özellikleri .....	27
2.2.3. Metallo Beta Laktamaz Tipleri .....	28
2.2.3.1. IMP Tipi Metallo Beta Laktamazlar .....	28
2.2.3.2. VIM Tipi Metallo Beta Laktamazlar.....	29
2.2.3.3. SPM-1.....	31
2.2.3.4. GIM-1.....	31
2.2.3.5. SIM-1 .....	31
2.2.3.6. AIM-1 .....	31
2.2.3.7. NDM-1 .....	31

2.2.3.8. DIM-1.....	32
2.2.4. Metallo Beta Laktamazların Epidemiyolojisi .....	32
2.2.4.1. Asya.....	32
2.2.4.3. Diğer Bölgeler .....	34
2.2.5. Metallo Beta Laktamazların Klinik Önemi.....	34
2.2.6. Metallo Beta Laktamazların Laboratuvar Tanısı .....	35
2.2.6.1. Modifiye Hodge Testi .....	35
2.2.6.2. İnhibitörlerle Yapılan Mikrobiyolojik Testler.....	36
2.2.6.2.1. Çift Disk Sinerji Testi.....	36
2.2.6.2.2. Kombine Disk Testi.....	36
2.2.6.2.3. E Test.....	36
2.2.6.2.4. Mikrodilasyon Testi .....	37
2.2.6.3 Karbapenem Hidrolizinin Araştırılması.....	37
2.2.6.4. Moleküler Testler .....	37
2.2.7. Metallo Beta Laktamaz Üreten <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Gereç .....	39
3.1.1. Çalışma Grubu.....	39
3.1.2. Araç ve gereçler .....	47
3.1.3. Kimyasallar .....	48
3.1.4. Besiyerleri .....	48
3.1.5. Çözeltiler .....	49
3.1.5.1. Tris HCl (1 M, pH: 8.0).....	49
3.1.5.2. EDTA (0.5 M pH: 8.0) .....	49
3.1.5.3. EDTA (0.5 pH: 9.5).....	50
3.1.5.4. TE Tamponu.....	50
3.1.5.5. dNTP Karışımı .....	50
3.1.5.6. Primer Karışımı .....	50
3.1.5.8. Yükleme tamponu .....	51
3.1.5.9. Etidyum Bromür.....	51
3.1.5.10. NaCl (5M) .....	51
3.1.5.11. N-laurilsarkozin (% 10).....	51
3.1.5.12. Proteinaz K Hazırlama Tamponu.....	51

3.1.5.13. Proteinaz K (10 mg/mL) .....	51
3.1.5.14. SE Tamponu .....	52
3.1.5.15. Hücre Lizis Tamponu .....	52
3.1.5.16. Restriksiyon Tamponu .....	52
3.1.5.17. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Karışımı .....	52
3.1.6. Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesi .....	52
3.1.6.1. Hasta Grupları .....	52
3.1.6.2. Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler .....	53
3.2. Yöntem .....	54
3.2.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirmesi .....	54
3.2.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	54
3.2.1.2. Metallo Beta Laktamazların Fenotipik Olarak Tanımlanması .....	55
3.2.1.2.1. Modifiye Hodge Testi .....	55
3.2.1.2.2. İmipenem/İmipenem-EDTA Kombine Disk Testi .....	55
3.2.1.3. Metallo Beta Laktamazların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması .....	56
3.2.1.3.1. DNA İzolasyonu .....	56
3.2.1.3.2. Metallo Beta Laktamaz Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler .....	57
3.2.1.3.3. Reaksiyon İçeriğinin Hazırlanması .....	57
3.2.1.3.4. Genlerin Amplifikasyonu .....	58
3.2.1.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme .....	58
3.2.1.4. Pulsed Field Gel Elektroforezi .....	59
3.2.1.4.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması .....	59
3.2.1.4.2. Bakterinin Agaroz Gömülmesi .....	59
3.2.1.4.3. Bakteriyel DNA'nın İzolasyonu .....	59
3.2.1.4.4. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi .....	60
3.2.1.4.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması .....	60
3.2.1.4.6. Elektroforez .....	61
3.2.1.4.7. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi .....	61
3.2.2. Klinik Özelliklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi .....	61
4. BULGULAR .....	63
4.1. Mikrobiyolojik Özellikleri .....	63
4.1.1 İzolatların Servislere Göre Dağılımı .....	63



4.1.2. İzolatların Materyale Göre Dağılımı .....	65
4.1.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları .....	66
4.1.4. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Fenotipik Testler ile Araştırılması.....	76
4.1.4.2 Kombine Disk Testi .....	76
4.1.5. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması .....	77
4.1.5.1. <i>bla</i> <sub>VIM</sub> Geninin PZR ile Araştırılması .....	77
4.1.5.2. <i>bla</i> <sub>IMP</sub> Geninin PZR ile Araştırılması .....	79
4.1.5.3. <i>bla</i> <sub>SPM</sub> , <i>bla</i> <sub>SIM</sub> , <i>bla</i> <sub>GIM</sub> Genlerinin PZR ile Araştırılması .....	80
4.1.6. MBL Tespitinde Fenotipik Testlerin PZR ile Karşılaştırılması .....	81
4.1.6.1. MBL Tespitinde Modifiye Hodge Testinin PZR ile Karşılaştırılması .....	81
4.1.6.2. MBL tespitinde kombine disk testinin PZR ile karşılaştırılması .....	81
4.1.7. MBL Tespit Edilen İzolatlarda Klonal İlişkinin Araştırılması .....	82
4.1.7.1. Pediatrik Yaş Grubu Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması .....	82
4.1.7.2. Erişkin Yaş Grubu Yatan Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması .....	84
4.1.7.3. Poliklinik Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması .....	86
4.2. Klinik Özellikler.....	87
4.2.1. MBL Üreten <i>P. aeruginosa</i> İzole Edilen Pediatrik Yaş Grubu Hastaların Demografik, Klinik ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması .....	87
4.2.2. MBL Üreten <i>P. aeruginosa</i> İzole Edilen Erişkin Yaş Grubu Hastaların Demografik, Klinik ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması .....	89
5. TARTIŞMA.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	109
7. ÖZET .....	112
9. KAYNAKLAR.....	114

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virülans mekanizması .....	6
Şekil 2. IMP tipi MBL'lerin filogenetik ilişkisi.....	29
Şekil 3. VIM tipi MBL'lerin filogenetik ilişkisi.....	30
Şekil 4. Çeşitli MBL tiplerinin dünya üzerindeki dağılımı .....	32
Şekil 5. İzolatların yıllara ve gönderildiği birimlere göre dağılımı .....	65
Şekil 6. Yıllara göre çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (antimikrobiyal duyarlılık test sonucu orta duyarlı bulunan izolatlar dirençli kabul edilmiştir).....	75
Şekil 7. Pediatrik yaş grubu yatan hastalarının VIM tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları .....	83
Şekil 8. Pediatrik yaş grubu yatan hastalarının IMP tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları. ....	83
Şekil 9. Erişkin yaş grubu yatan hastalarının VIM tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları .....	85
Şekil 10. Erişkin yaş yatan hastalarının IMP tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları. ....	85
Şekil 11. Poliklinik hastalarının VIM tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları .....	86
Şekil 12. Poliklinik hastalarının IMP tipi MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları. ....	87
Şekil 13. Erişkin yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> varlığının mortaliteye etkisinin Kaplan Meier mortalite testi ile değerlendirilmesi .....	91

## TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Klinik önemi olan <i>Pseudomonas</i> 'ların sınıflandırması .....	3
Tablo 2. Klinik örneklerde saptanan <i>Pseudomonas</i> türlerinin bazı biyokimyasal özellikleri .....	5
Tablo 3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virulans faktörleri ve fonksiyonları .....	6
Tablo 4. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunan eflüks sisteminin yapısı ve substrat özellikleri .....	20
Tablo 5. Beta laktamazların sınıflandırması.....	22
Tablo 6. <i>P. aeruginosa</i> 'da tespit edilen Sınıf A GSBL tipleri .....	24
Tablo 7. Metallo betalaktamazların sınıflandırılması.....	27
Tablo 8. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri.....	39
Tablo 9. Hastaların klinik özelliklerini değerlendirme formu .....	53
Tablo 10. PZR'de kullanılan primerlerin sekansları, ürün büyüklükleri.....	57
Tablo 11. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları.....	58
Tablo 12. Çalışma izolatlarının birimlere ve yıllara göre dağılımı .....	63
Tablo 13. Çalışma izolatlarının izole edildiği materyallere göre dağılımı .....	65
Tablo 14. Çalışma izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları .....	66
Tablo 15. Modifiye Hodge testi sonuçları .....	76
Tablo 16. İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi sonuçları.....	77
Tablo 17. PZR ile <i>bla<sub>VIM</sub></i> tespit edilen izolatlar.....	78
Tablo 18. PZR ile <i>bla<sub>IMP</sub></i> tespit edilen izolatlar .....	80
Tablo 19. MBL tespitinde Modifiye Hodge testinin PZR ile karşılaştırılması .....	81
Tablo 20. MBL tespitinde kombine disk testinin PZR ile karşılaştırılması .....	82
Tablo 21. Pediatrik yaş grubu yatan hastalardan izole edilen MBL üreten <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının özellikleri.....	82
Tablo 22. Erişkin yaş grubu yatan hastalardan izole edilen MBL üreten <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının özellikleri.....	84
Tablo 23. Erişkin yaş grubu poliklinik hastalardan izole edilen MBL üreten <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının özellikleri.....	86
Tablo 24. Pediatrik yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitifliğinin demografik, klinik ve mikrobiyolojik özellikler ile ilişkisi .....	88

Tablo 25. Erişkin yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitifliğinin demografik, klinik ve mikrobiyolojik özellikler ile ilişkisi .....	89
Tablo 26. Pseudomonaslarda MBL ve karbapenemaz tespiti açısından Modifiye Hodge testinin değerlendirilmesi .....	101
Tablo 27. Psödomonaslarda MBL ve karbapenemaz tespiti açısından imipenem/imipenem+EDTA kombine disk testinin değerlendirilmesi .....	102

**RESİMLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Resim 1. a) <i>P. aeruginosa</i> 'nın renkli elektron tarama mikroskopunda (scanning electron microscope, SEM) görünümü (25), b) <i>P. aeruginosa</i> 'nın %5 koyun kanlı agarda koloni görünümü. ....	4
Resim 2. MBL üretiminin Modifiye Hodge testi ile araştırılması .....	76
Resim 3. MBL üretiminin kombine disk testi ile araştırılması .....	77
Resim 4. <i>bla<sub>VIM</sub></i> (A) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü .....	78
Resim 5. <i>bla<sub>VIM</sub></i> (B) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü .....	78
Resim 6. <i>bla<sub>IMP</sub></i> (A) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü.....	79
Resim 7. <i>bla<sub>IMP</sub></i> (B) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü.....	80

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Toplum kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra hastane enfeksiyonlarında önemli bir etken olan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bakteriyemi, pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (1,2). *P. aeruginosa*'nın pek çok ilaç grubuna karşı intrinsek dirence sahip olması ve kazanılmış direnç geliştirebilme yeteneği nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi güçtür ve uygun antimikrobiyal tedaviye rağmen mortalite oranları yüksektir (3-5).

Karbapenemler yüksek antipsödomonal etkinliğe sahip olan ve çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında son tercih olarak kullanılan antibiyotiklerdir (6,7,8). Metallo beta laktamazlar (MBL'ler), monobaktamlar dışındaki beta laktam ajanları hidrolize edebilen ve hareketli genetik materyaller ile taşınarak bakteri türleri arasında hızla aktarılabilen dirençten sorumlu enzimlerdir (2,3,5,9). Genellikle *P. aeruginosa*'da diğer direnç mekanizmalarının da birlikte bulunması monobaktamlara da direncin gözlenmesine neden olmaktadır. MBL'ler klavunat, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile de inhibe edilememektedirler (2,3,9). Bu özellikler MBL üreten izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve yan etkilerinin fazla olmasına rağmen kolistin genellikle tek seçenek olmaktadır (9-13).

MBL'ler sadece *P. aeruginosa*'da değil, *Acinetobacter baumannii* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri gibi diğer gram negatif bakteriler arasında da görülmektedir (11-13). Tüm dünyada en yaygın olanlar IMP ve VIM tipi MBL'ler olmakla birlikte dağılımları bölgesel farklılıklar göstermektedir (9,11-13).

Türkiye'de ilk MBL *P. aeruginosa* izolatında Bahar ve ark. (14) tarafından 2003 yılında saptanmış ve *blaVIM-5* olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde sadece IMP ve VIM tipi MBL'ler saptanmıştır. 2007 yılı öncesinde hastanemizde yapılmış bir çalışmada 100 *P. aeruginosa* izolatından birinde VIM tipi ve dokuzunda IMP tipi MBL geni tespit edilmiş ve IMP-1 üreten izolatların klonal ilişkili olduğu bildirilmiştir (15).

MBL'lerin yayılımının hızlı olması, çeşitliliğinin her geçen gün artması ve türler arası yayılım gösterebilmesine karşın bu enzimlerin tanımlanmasında kullanılabilecek yöntemlerin standardizasyonu henüz sağlanamamıştır (9,11,16,17). MBL'lerin moleküler biyolojisi ve genetiği ile ilgili önemli bilgiler mevcut olmasına rağmen epidemiyolojik veriler ve klinik deneyimler yetersizdir (11,18). MBL üretiminin klinik etkisi, hastane enfeksiyon kontrol ve antimikrobiyal tedavi politikaları üzerine etkisi de net olarak belirlenmemektedir (16).

Ülkemizde MBL üreten *P. aeruginosa* sıklığı ve MBL tiplerinin dağılımı ile ilgili veriler oldukça kısıtlıdır. Aynı zamanda ülkemizde MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının klonal ilişkisinin altın standart yöntem olarak kabul edilen Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) ile incelendiği çalışma mevcut değildir. Ayrıca MBL'lerin moleküler ve genetik yapısı ve epidemiyolojik özelliklerinin yanı sıra hastane enfeksiyon kontrolü ve bu enfeksiyonlar için tedavi stratejilerinin belirlenebilmesi için MBL varlığı açısından risk faktörlerinin ve MBL saptanan izolatların mortaliteye etkisinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada 2008-2010 yılları arasında hastanemizde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL sıklığının ve tiplerinin belirlenmesi, MBL saptanan izolatlar arasında klonal ilişkinin PFGE ile araştırılması, MBL pozitif *P. aeruginosa* izole edilen hastalara ait çeşitli mikrobiyolojik, demografik ve klinik özelliklerin belirlenmesi ve bu özelliklerin MBL ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

#### 2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Sédillot'un 1850'de Fransız askerlerinin yaralarında mavi renkli akıntı tariflemesiyle *Pseudomonas* tarihte ilk kez yer almıştır. Ancak bu akıntıya sebep olan organizma 1882 yılında tanımlanabilmiş ve *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirilmiştir. 1990'da Migula, Yunanca yalancı anlamına gelen 'pseudes' ve birim anlamında kullanılan 'monas' terimlerinden oluşan *Pseudomonas* tanımını cins adı olarak; *Pseudomonas pyocyanea* tanımını ise tür adı olarak kullanmıştır (6). 1923 yılında yayınlanmış olan Bergey'in El Kitabı'nda *Pseudomonas*'ın fenotipik özelliklerine göre bir sınıflandırma yer almıştır. 1960' lı yılların sonlarında DNA-DNA hibridizasyon tekniklerinin gelişmesiyle fenotipik sınıflandırma tamamlanmıştır (19-21). Tablo 1'de görüldüğü gibi, 1984'te Palleroni, bu genusu rRNA homolojilerine göre beş gruba ayırmıştır ve Psödomonaslar rRNA homoloji grup I'de yer almıştır (9,22,23).

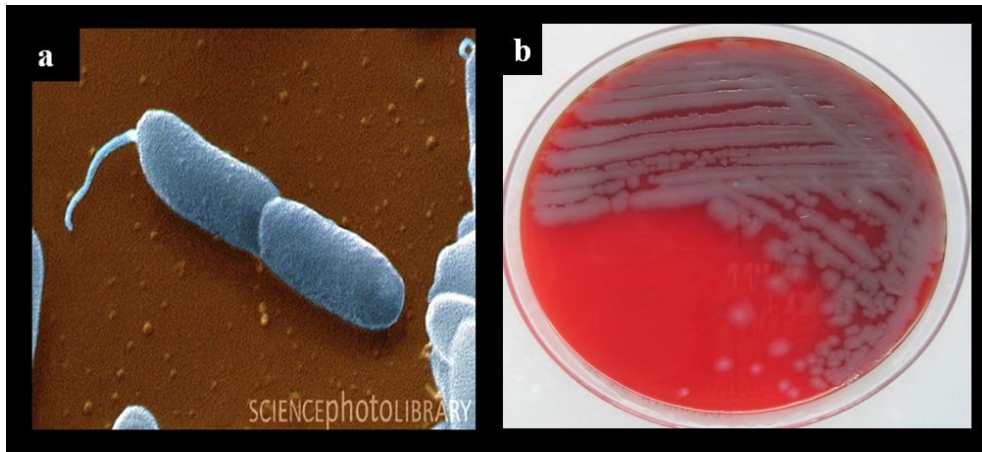
**Tablo 1. Klinik önemi olan *Pseudomonas*'ların sınıflandırması, (22,23).**

rRNA Homoloji Grup	Tür	Oksidaz özelliği	
<b>I. <i>Pseudomonas</i></b>	King's B Agarda	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pozitif
	Floresan	<i>Pseudomonas flourescens</i>	Pozitif
		<i>Pseudomonas putida</i>	Pozitif
	Nonfloresan	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Pozitif
		<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Pozitif
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Pozitif
<b>II. <i>Burkholderia</i></b>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Pozitif	
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Pozitif	
	<i>Burkholderia mallei</i>	Pozitif/Negatif	
	<i>Ralstonia pickettii</i>	Pozitif	
	<i>Burkholderia gladioli</i>	Pozitif	
<b>III. <i>Delfia</i></b>	<i>Delfia acidovorans</i>	Pozitif	
<b>IV. <i>Brevundimonas</i></b>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Pozitif	
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Pozitif	
<b>V. <i>Stenotrophomonas</i></b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negatif	



### 2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

*Pseudomonas aeruginosa* aerob, sporsuz, 0.5-1.0 µm boyutlarında gram negatif basildir. Çoğunlukla tipik koloni yapısı, besiyerine yayılan pigmentleri ve kendisine has kokusu ile primer izolasyon besiyerlerinde kolaylıkla tanınabilmektedir (6,22-24).



**Resim 1. a) *P. aeruginosa*'nın renkli elektron tarama mikroskopunda (scanning electron microscope, SEM) görünümü (25), b) *P. aeruginosa*'nın %5 koyun kanlı agarda koloni görünümü.**

37°C'deki agar kültürlerinde çoğunlukla düzensiz kenarlı düz koloniler (tip 1) oluştururlar, bazıları ise koliform (tip 2) görünümündedirler. Kuru (tip 3), mukoid (tip 4), buruşuk (tip 5) ve cüce (tip 6) koloni gibi diğer koloni tipleri oldukça nadir görülmektedir. Mukoid koloni formasyonu özellikle kistik fibrozis (KF) hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilen suşlarda görülmektedir (6,22). 10-44°C sıcaklık aralığında üreyebilmektedir ancak optimal üreme sıcaklığı 35°C'dir. 42°C'de üreme özelliği ile de klinik önemi olan diğer pseudomonaslardan ayrılmaktadır (6).

*Pseudomonas aeruginosa*'nın, mavi renkli piyosyanin (fenazin pigment) ve sarı renkli piyoverdin (florasan pigment) pigmenti üretimi ile agar kültürlerinde mavi-yeşil renk oluşturması karakteristiktir. Belirli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları içermesi ile florasan üretiminin baskılandığı King's A besiyerindeki kültürlerde gözlemlenebilen piyosyanin üretimi türe özgüdür. Daha az oranda tuz içeren King's B besiyerindeki kültürlerin ultraviyole ışık altında incelenmesiyle gözlemlenebilen piyoverdin ise suda çözünebilir ve besiyerine diffüze olabilen bir pigmenttir. Suda çözünen piyorubin (kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi/siyah) ise daha az sıklıkta

karşılaşılan pigmentlerdir. Ayrıca pigmentler bakterinin demir alımı için siderofor olarak da görev yapabildiklerinden demirin az olduğu ortamlarda pigment üretimi artmaktadır (6,22,23,26).

Tek polar flajellası sayesinde hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türleri birden fazla flajellaya sahip olduğundan, bu özelliği ile diğer türlerden ayrılmaktadır. Hareketliliğini sağlayabilmek için moleküler oksijen varlığına gereksinim duyar. Oksijenin son elektron alıcısı olarak kullanılması nedeniyle zorunlu aerob bir metabolizmaya sahiptir. Ancak nitratı ya da arjinini son elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle anaerob olarak da üreyebilmektedir (24,26).

Bütün *Pseudomonas* türleri glukozu ve diğer şekerleri oksidatif yolla metabolize etmektedirler. Bütün suşlar sitokrom oksidaz enzimi üretirler ve bu özellik Kovac's ayracı kullanılarak yapılan oksidaz testi ile gözlemlenmektedir. Oksidaz aktivitesi göstermeyen suşlar nadir de olsa görülmektedir. Ayrıca nitratı nitrojen gazına indirgeyebilmektedir ve arjininden amonyak oluşturabilmektedir. Demirli ve üç şekerli besiyerinde ise alkalın renk değişimi olması ya da hiç renk değişimi olmaması gözlenmektedir. *P. aeruginosa*'nın klinikte sık karşılaşılan diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırımında kullanılan özellikler Tablo 2'de özetlenmiştir (9,24,27).

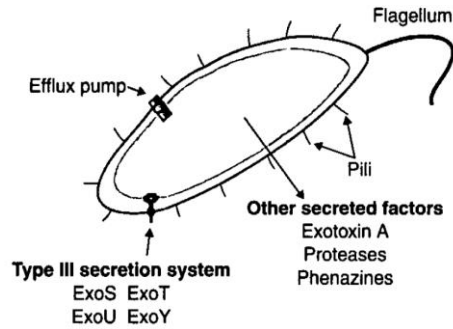
**Tablo 2. Klinik örneklerde saptanan *Pseudomonas* türlerinin bazı biyokimyasal, özellikleri (24).**

Test	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
Oksidaz	%99	%97	%100	%100
42°C'de üreme	%100	0	0	%69
Nitrat redüksiyonu	%98	%19	0	%100
Nitrattan gaz oluşumu	%93	%3	0	%100
Piyoverdin	%65	%96	%93	0
Üre hidrolizi	%48 (9 <sup>a</sup> )	%21 (31 <sup>a</sup> )	%31 (44 <sup>a</sup> )	%33 (22 <sup>a</sup> )
Glukozdan asit oluşumu <sup>b</sup>	%97	%100	%100	%96 (4)
Simmons sitrat	%95	%93	%94 (6 <sup>a</sup> )	%82 (14 <sup>a</sup> )
Flajel sayısı	1	>1	>1	1

<sup>a</sup> Parantez içindeki yüzdeler geç reaksiyon veren suşlara aittir.

<sup>b</sup> %1 karbonhidrat içeren oksidatif fermantatif bazal ortam.

### 2.1.3. Virülans Faktörleri



Şekil 1. *P. aeruginosa*'nın virülans mekanizması, (1).

Tüm *Pseudomonas* türleri içinde fırsatçı patojen olarak en sık rastlanan tür *P. aeruginosa*'dır (27). Aynı zamanda, pek çok antimikrobiyal ajana direnç geliştirebilmekle birlikte; Şekil 1'de görüldüğü gibi toksin ve enzim formunda çok sayıda virülans faktörü salgılayabilmektedir ve faktörlerin fonksiyonları Tablo 3'de özetlenmiştir (1,27,28).

Tablo 3. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri ve fonksiyonları, (28).

Virülans Faktörü	Fonksiyonu
<b>Fimbria</b>	Konak hücreye tutunma ve proinlamatuvar gen ekspresyonunun aktivasyonu
<b>Flajella</b>	Motilite, konak hücreye bağlanma, IL-8 aktivasyonu
<b>Tip III salgılama sistemi</b>	Toksinlerin konak hücreye enjeksiyonu (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY)
<b>ExoS</b>	Tümör nekrozis faktör stimülasyonu
<b>ExoT</b>	GTPaz aktivasyonu
<b>ExoU</b>	Sitotoksin
<b>ExoY</b>	Adenilat siklaz aktivasyonu
<b>Quorum sensing molekülleri</b>	Diğer pseudomonasların gen ekspresyonunun koordinasyonu ve biyofilm oluşumu
<b>Piyoverdin</b>	Demirin bağlanması
<b>Elastaz, proteaz, hemolizinler ve lökositin</b>	Dokuya invazyon ve konak hücrenin lizisi
<b>Pyosiyenin</b>	Lenfosit proliferasyonunun ve silya fonksiyonlarının inhibisyonu, oksijen radikallerinin üretimi
<b>Ekzotoksin A</b>	Konak hücrede protein sentezinin inhibisyonu, organizmanın yayılımı
<b>Lipopolisakkarid</b>	Endotoksin
<b>Aljinat</b>	Serbest radikal tutucu, fagositozun, nötrofil kemotaksisinin ve kompleman aktivasyonunun inhibisyonu

#### 2.1.3.1. Flajella ve Adhezinler

Flajella, hareketlilik sağlamanın yanı sıra doku yüzeyi ile ilk etkileşimde rol oynayan önemli bir virülans faktörüdür (26). Pililer ise konak hücre membranına ve diğer yüzeylere

tutunmada görev almaktadır. *P. aeruginosa*'nın solunum yolları epitelinde bağlandığı reseptör asialo-gangliozid MI (aGMI)'dir. aGMI ekspresyonunun çoğunlukla epitel hasarı sonrası ve hücre yenilenmesi esnasında gerçekleşmesi, *P. aeruginosa*'nın hasarlı solunum yoluna adhere olma sebebini açıklamaktadır (28-31).

Flajellin proteini, respiratuar sistemdeki müesine bağlanarak mikroorganizmanın solunum yolundan temizlenmesini kolaylaştırmaktadır. Makrofajlar gibi fagositik hücreler için ligand görevi üstlenmektedir. Bu durumla ilişkili olabilmesi muhtemeldir ki, kistik fibrozis (KF) hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşları flajelladan yoksundur ve fagositozdan kaçarak kronik enfeksiyonlar oluşturabilmektedir (6, 29-31).

*P. aeruginosa*'nın konak dokuya ya da müsinlere tutunmasında rol oynayan adhezinler: pili, müsin bağlayan dış membran proteini (*mucin-binding outer membrane protein F*, OM protein F), yüzey lektinleri ve mukoid ekzopolisakkarid (aljinat) olmak üzere dört grupta toplanır (6,26).

Pililer, *pilA* geninin protein polimerleridir. Fakat oluşumlarında ve fonksiyonlarında çok sayıda gen rol oynamaktadır. Pililerin, bakteri virulansında rol aldığı ve sitotoksitede etkisi olduğu görülmüştür. Tip 4 pilus olarak bilinen temel pili türü, bakterinin solid yüzeylere tutunmasından, bakteriyofajların bağlanmasından ve girişinden sorumludur (29-31).

*Pseudomonas aeruginosa* iki tür yüzey lektini sentezlemektedir: PA-IL olarak adlandırılan galaktoza ve PA-IIL olarak adlandırılan ise fukoza bağlanmaktadır (29-31).

Bakterinin yüzeye yapışmasıyla, aljinat biyosentetik geninin transkripsiyonu indüklenmektedir. Bakteri hücresi ve aljinattan oluşan konsorsiyum biyofilm formasyonunun temelini oluşturmaktadır ve bakteriyi çevresel koşullar ve antibiyotik gibi faktörlerden korumaktadır (6).

### 2.1.3.2. Lipopolisakkarid

*Pseudomonas aeruginosa*, genel olan A-bant ve serotipe özgü olan B-bant olmak üzere iki farklı kimyasal özellikte lipopolisakkarid (LPS) üretmektedir. A-bant LPS tek düze antijenik yapıya sahipken; B-bant LPS lipid A, kor polisakkarid ve O-özgül bölge zinciri olmak üzere üç birimden oluşmaktadır. A-bant ya da B-bant LPS'den birinin diğerine göre fazla ekspresyonu, yüzey antijenik özelliklerinde değişiklik sağlayarak, immün yanıtı kaçırmaya yardımcı olmaktadır (6). O-özgül bölge zincirleri, komplemanın litik

etkisini önlemektedir. O antijenine spesifik antikorlar sadece hayvan modellerinde değil insanda da koruyucu olmuşlardır (32).

### 2.1.3.3. Ekstraselüler Polisakkaridler

Bütün *P. aeruginosa* izolatları, hücrenin etrafında büyük genellikle polisakkaridlerden meydana gelen ekstraselüler slime kümeleri oluşturmaktadır. Mukoid suşlar tarafından aşırı miktarda üretilen aljinat polisakkaridi,  $\beta$ -1,4 D-mannuronik asit ve L-glukronik asitten oluşmuştur. Bu oluşum mukoid koloninin fiziksel görüntüsünü vermektedir (6).

### 2.1.3.4. Ekzotoksinler

Ekzotoksin A (ETA) *P. aeruginosa*'nın ürettiği ekzoenzimler içinde en toksik olanıdır ve ökaryotik hücrede elongasyon faktör 2'yi (EF-2'yi) inhibe ederek protein sentezini bozmaktadır. ETA yanık yaralarında oluşan dermatonekroz, oküler enfeksiyonlarda korneal hasar ve kronik pulmoner enfeksiyonlarda doku hasarında rol oynamaktadır. Ayrıca T hücrelerine mitojenik ve interlökin-1 (IL-1) üzerine indükleyici etki göstermektedir (6, 26, 33).

Ekzoenzim S, ekzoenzim T, ekzoenzim U ve ekzoenzim Y olmak üzere başlıca dört proteinden oluşan Tip III salgılama sistemi, *P. aeruginosa* epitel hücrelerine bağlandığında aktive olmaktadır. Bakteriyel toksinler hücreye bu sistem aracılığıyla enjekte edilmektedir. Bu şekilde aktive olan immün sistem aracılığıyla hücre hasarı ve nekroz meydana gelmektedir. Tip III salgılama sistemi, daha çok akut ve invaziv enfeksiyonlarla ilişkili bulunmuştur. Pnömoni hastalarında, Tip III salgılama sisteminin ekspresyonu solunum yetmezliği, sepsis ve mortalite oranlarında artış ile ilişkilendirilmiştir (28).

### 2.1.3.5. Proteazlar

*Pseudomonas aeruginosa* jelatin, kazein, elastin, kollajen ve fibrin gibi çok sayıda substrata etkili olabilen proteolitik enzimlere sahiptir. Bu enzimler üç grupta toplanmaktadır; genel proteazlar, elastaz ve alkalın proteaz (23).

Elastaz, Las A (serin proteaz) ve Las B (çinko metalloproteaz) olmak üzere elastini sinerjistik olarak indirgeyebilen iki enzimden oluşmaktadır. Elastazın, akciğer parankim dokusu ve diğer elastin içeren dokulardaki hasar ve yaygın *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oluşan hemorajik lezyonlarla (ektima gangrenozum) ilişkili olduğu görülmüştür. Bu iki enzim kompleman bileşenlerinin indirgenmesi, nötrofil kemotaksisi ve fonksiyonlarının inhibisyonuyla akut enfeksiyonlarda doku hasarına neden olmaktadır. Kronik enfeksiyonlar, enfekte dokuda immün kompleks birikimi ve bu enzimlere karşı antikor oluşumu ile karakterizedir (6).

Alkalin proteaz da elastaz gibi doku hasarı ve enfeksiyonun yayılmasına neden olmaktadır (26).

#### **2.1.3.6. Hemolizinerler**

*Pseudomonas aeruginosa*'da ısıya duyarlı olan Fosfolipaz C ve ısıya dayanıklı olan ramnolipid olmak üzere iki tür hemolizin identifiye edilmiştir (6). Fosfolipaz C, lipid ve lesitin bağlarını kırmak suretiyle doku hasarına yol açmaktadır. Ayrıca sitoplazmik membran ve pulmoner surfaktanı hasara uğratmaktadır ve opsoninleri inaktive etmektedir. Hemolizin üretimi ile solunum ve idrar yolu enfeksiyonları arasında ilişki gösterilmiş olduğu halde fosfolipaz C'nin rolü kesinlik kazanmamıştır (23, 26).

Ramnolipid, ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten ibaret olup deterjan benzeri bir etki göstermektedir. Fosfolipaz C ile birlikte fosfolipidler üzerinde oluşturduğu çözücü etki ile akciğer yüzey gerilimini inaktive etmektedir (6).

#### **2.1.3.7. Sideroforlar**

*P. aeruginosa*, enfeksiyonun oluşumu ve devamlılığı sırasında piyoşelin ve piyoverdin gibi demir şelatörlerini kullanarak demir alımını sağlamaktadır (6).

#### **2.1.3.8. Piyosiyenin ve Piyoverdin**

*P. aeruginosa* tarafından üretilen ve mavi renkte olan piyosiyenin pigmenti hidrojen peroksit ve süperoksit üretimini katalizlemektedir. IL-8 salınımını uyarak nötrofil aktivasyonunu artırmaktadır (26,34). Ayrıca piyosiyenin *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

*aureus* ve *Mycobacterium smegmatis* gibi pek çok tür için bakterisidal aktivite göstermektedir (27).

Sarı-yeşil renkte olan piyoverdin ise demiri bağlayan bir siderofordur. Ekzotoksin A ve diğer virulans faktörlerinin salınımını da düzenlemektedir (26).

### **2.1.3.9. Quorum Sensing**

Quorum sensing (QS) sistemi, bireysel bir bakteri tarafından üretilen ve diffüze olarak çevredeki mikroorganizmalar tarafından algılanabilen küçük sinyal moleküllerinden oluşmaktadır (34,35). *P. aeruginosa*'da bu moleküller açıl homoserin laktonlardır. Bakteri popülasyonu belirli bir yoğunluğa ulaştığında bakteri metabolizmasında oluşan bir takım değişiklikler sonucu bazı genler eksprese edilir. Bu süreçte *las* sistemi ve *rhl* sistemi olmak üzere iki farklı sistem tanımlanmıştır. Elastaz, alkalin proteaz, hemolizin, rhamnolipid ve ekzotoksin A gibi *P. aeruginosa*'nın ürettiği pek çok virulans faktörünün QS sistemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (35,36). Bu sistem aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın patogeneğinde son derece önemli olan biyofilm oluşumunda da rol oynamaktadır. Açıl homoserin laktonlar *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan KF hastalarının akciğerlerinde de saptanmıştır (6,34-36).

### **2.1.3.10. Diğer Virulans Faktörleri**

Nöraminidaz, GM1 gangliozid reseptörlerinin yapısından sialik asit rezidülerini çıkartarak pililerin epitel hücresi yüzeyindeki bu reseptörlere yapışmasını sağlamaktadır (23).

Lökosidin, nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını inhibe etmektedir (23).

Enterotoksin, ise normal gastrointestinal aktiviteyi bozarak diyareye yol açmaktadır (23).

### **2.1.4. Epidemiyoloji**

*Pseudomonas* türleri, geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmeleri ve değişik besin kaynaklarını kullanabilmeleri nedeniyle doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar (24). Suda çözülmüş haldeki besinlerden gaz oluşturarak çoğalabildiği düşünülmüştür ve bu sayede

lavabolar, sebzeler, nehir suları ve dezenfektanlar gibi nemli ortamda sıklıkla bulunmaktadır (6,24,37).

*Pseudomonas aeruginosa* sağlam ve kuru ciltte uzun süre yaşayamayacağından sağlıklı kişilerde taşıyıcılık geçicidir ya da nadirdir. Doğal ortamlarda yaygın olarak bulunmasına ve pek çok virulans faktörüne sahip olmasına rağmen toplum kökenli enfeksiyonların insidansı oldukça düşüktür (6). Fiziksel şartlara, kimyasal ve antibakteriyal ajanlara toleransları sayesinde tehlikeli bir fırsatçı patojen haline gelebilmektedir (27). Hastanede uzun süre yatışın söz konusu olduğu, özellikle immünsüprese, debilize hastalarda ya da yanık hastalarında insidansı artmaktadır. Uzun süre hastanede yatış öyküsü olanlarda tükürükte ve fekal taşıyıcılıkta dikkat çekici bir artış bildirilmiştir. Yanık hastalarında ise cilt kolonizasyonu özellikle yanığın dokuzuncu gününden sonra artmaktadır. Dezenfektan, antiseptik, intravenöz mayi ve lens solüsyonu gibi hastanede kullanılan pek çok ekipman ve malzeme *P. aeruginosa* için rezervuar durumundadır. Kötü sterilizasyon koşulları, kontamine musluk başları, lavabolar ve hastane çalışanlarının elleri ile kontaminasyon *P. aeruginosa* kaynaklı salgınlarda suçlanan faktörler arasındadır (6,37,38).

*Pseudomonas aeruginosa*'nın önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmesi immünsüpresiflerde, KF hastalarında ve yanıklı hastalarda yol açtığı enfeksiyonlar nedeniyle ancak 1960'lı yıllarda gündeme gelmiştir (39). Günümüzde ise, bölgelere, hastane ünitesine ve çalışmaya göre değişiklik göstermekle birlikte, hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10'undan sorumlu tutulmaktadır (6). KF hastalarının solunum yollarında en sık saptanan patojendir ve yanık hastalarında ortaya çıkan pek çok ciddi enfeksiyona yine *P. aeruginosa* neden olmaktadır (6,24).

## **2.1.5. Enfeksiyonları**

### **2.1.5.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları**

Alt solunum yollarındaki *P. aeruginosa* enfeksiyonları treakeobronşit gibi hafif bir tablodan daha ciddi seyreden nekrotizan pnömoniye kadar farklı klinik durumlarla karşımıza çıkabilmektedir (21).

*Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu toplum kökenli pnömoni, malignensi veya kronik pulmoner hastalık gibi altta yatan hastalık ya da intravenöz ilaç kullanım



öyküsü olanlar dışında oldukça nadir görülmektedir. Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*, AIDS) hastalarında toplum kökenli alt solunum yolu enfeksiyonu etkeni olarak rapor edilmiştir. Hospitalize hastalarda özellikle trekeostomililerde sıklıkla alt solunum yollarında kolonize olmaktadır. KF hastaları, kronik akciğer hastalığı olanlar ve nötropenili hastalarda kolonizasyon sıklıkla görülmektedir. KF hastalarında oluşan enfeksiyonlar altta yatan hastalığın alevlenmesi ve invaziv pulmoner hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu tür hastaların örneklerinden izole edilen suşlar genellikle mukoid özellikte ve pek çok antibiyotiğe dirençlidir (6,26,40).

### 2.1.5.2. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Birincil deri enfeksiyonlarına neden olmakla birlikte, *P. aeruginosa* bakteriyemisi sırasında ektima gangrenozum olarak adlandırılan karakteristik cilt lezyonu gelişebilmektedir. Ektima gangrenozum lezyonları hemorojik, nekrotik ve ülser olabilen veziküller şeklindedir. Lezyonların mikroskopik incelemesinde mikroorganizmanın kendisi bol miktarda görülürken az sayıda nötrofil görülmektedir (26).

Kontamine sularla (sıcak su muslukları, yüzme havuzları, jakuziler gibi) temas sonrasında yaygın makülopapüler ya da vezikülopüstüler raş ile karakterize follikülit veya interdijital aralıkta dermatit gibi cilt enfeksiyonları görülebilmektedir (6,26,41). Aknesi olanlarda ve deepilasyon sonrasında cilt enfeksiyonları, ayrıca manikür sonrasında tırnak enfeksiyonları da görülebilmektedir (26). *P. aeruginosa* cerrahi türü, bölgesi ve altta yatan hastalığa bağlı olarak cerrahi alan yaralarında sık izole edilen etkenlerdendir (6).

*Pseudomonas aeruginosa*, yanık enfeksiyonlarında sık etkenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ciddi yanık hastalarında yaranın kolonizasyonu genellikle lokalize damar hasarı, doku nekrozu ve sonrasında bakteriyemi ile sonuçlanmaktadır *P. aeruginosa* ile enfekte yanığı olanlarda hospitalizasyon süresi uzamıştır ve mortalite artmıştır (6,26).

### 2.1.5.3. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları

Kemik ve eklem enfeksiyonları, penetran yaralanmalar sonucu olabileceği gibi diyabetik hastalar veya intravenöz ilaç kullananlarda hematogen yayılım sonucu oluşabilir ve kronik osteomyelit ile sonuçlanabilmektedir. Septik artrit sık görülmeyen bir klinik tablodur ve genellikle predispozan bir klinik durum ya da ilaç suistimali öyküsü söz

konusudur. Ayrıca temporal kemiğin *P. aeruginosa* enfeksiyonu (mastoidit), özellikle çocuklarda otitis media komplikasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır (6,42).

#### **2.1.5.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları**

*Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) çoğunlukla hastane kökenli olup uzun süreli üriner sistem kateterizasyonu ile ilişkilidir. Bu hastalar çoğunlukla çoklu antibiyotik tedavisi altında olan hastalardır. Anatomik bir anomalisi olan veya spinal kord yaralanmaları dışında toplum kökenli ÜSE oldukça nadir görülmektedir (6,26,43).

#### **2.1.5.5. Kulak Enfeksiyonları**

Yüzme öyküsü ile ilişkili olan ve yüzücü kulağı olarak adlandırılan otitis eksternanın etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedir. Yaşlı ve diabetik hastalarda *P. aeruginosa*, dış kulak yolunda erozyona yol açan ve topikal antimikrobiyal tedaviye cevap vermeyen malign otitis externaya yol açmaktadır. Bu klinik tablo, kemik doku ve kranial sinirlerde harabiyete sebep olmaktadır ve %20 oranında mortalite ile seyretmektedir. *P. aeruginosa* ayrıca kronik otitis medianın etkenleri arasında sayılmaktadır (41,42).

#### **2.1.5.6. Göz Enfeksiyonları**

Lens solüsyonlarının, göze uygulanan ilaçların ya da kozmetik malzemenin *P. aeruginosa* ile kontaminasyonu sonucu konjonktivit, korneal ülserler, keratit, endoftalmit ya da orbital selülit gibi enfektif tablolar görülmektedir (6,44).

#### **2.1.5.7. Bakteriyemi ve Endokardit**

*P. aeruginosa*'ya bağlı bakteriyemi nötropenik, diabetik, geniş yanıklı ya da hemotolojik malignensili hastalarda daha sık gözlenmektedir ve mortalitesi daha yüksektir. Genellikle bakteriyemi alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE), ÜSE ve deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Bakteriyemili hastaların bir kısmında özgül deri lezyonları (ektima gangrenozum) görülmektedir. İntravenöz ilaç kullananlarda görülen

*P. aeruginosa* endokarditi, kontamine olmuş şahsi eşyalar ile bulaşmaktadır ve kronik seyretmektedir (26,44,45).

#### **2.1.5.8. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

Altta yatan kronik hastalığı olanlar, transplantasyon hastaları, nörocerrahi geçirmiş hastalar ve yenidoğanlar, *P. aeruginosa*'ya bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonu açısından risk altındadırlar. Kronik otitis eksterna ya da mastoiditli hastalarda intrakranial apseler gözlenebilmektedir. Beyin omurilik sıvısı basıncının monitörize edildiği hastalar ve perkutan eksternal ventriküler katateri bulunanlarda nazokomiyal bulaş söz konusu olabilmektedir (6,45).

#### **2.1.6. Laboratuvar Tanısı**

##### **2.1.6.1. Örnek Alınması Taşınması ve Saklanması**

*Pseudomonas aeruginosa* çok çeşitli ortamlarda üreyebilmektedir. Bu nedenle bakteriyolojik açıdan kabul gören standart örnek alma, taşıma ve saklama teknikleri kullanılarak laboratuvara gönderilen örnekler *P. aeruginosa* araştırılması açısından uygun kabul edilmektedir (27).

##### **2.1.7.2. Mikroskopik İnceleme**

Gram boyalı preparatın mikroskopik incelemesinde, tek tek ya da çiftler halinde, gram negatif boyanmış, ince çomakların görülmesi patognomonik olmamakla birlikte *P. aeruginosa* olabileceği konusunda bilgi vermektedir. Klinik tablonun uyumlu olması durumunda bu mikroskopik inceleme bulguları ampirik tedavi için yol gösterici olabilmektedir (6).

##### **2.1.7.3. Kültür ve Tanımlama**

*Pseudomonas aeruginosa*, %5 koyun kanı içeren triptik soy veya colombia agar, çikolatamsı agar ve Mac Conkey agar gibi besiyerlerinde üretilmektedir. Beta hemoliz yapan, mavi-yeşil renkli ve düz-yaygın kenarlı kolonilerin görülmesi, karakteristik üzüm

kokusunun varlığı gibi morfolojik özellikler ve pozitif oksidaz reaksiyonu bu izolatların ilk tanımlamaları için yeterli olabilmektedir (26,44,45). Üç sekerli demirli besiyerinde fermentatif etki gözlemlenmemesi, 42°C'de üreyebilmesi diğer tanı koydurucu özelliklerdendir. Bu testlerin yanı sıra glukoz oksidasyonu, asetamit hidrolizi ve nitratların nitrojen gazına redüksiyonu testlerine de ihtiyaç duyulabilmektedir (27,44,45). Oksidaz aktivitesi göstermeyen izolatlar nadiren rastlanabilmektedir ancak bu izolatların diğer karakteristik özelliklere sahip oldukları unutulmamalıdır (27).

Kistik fibrozis hastalarının mukoid *P. aeruginosa* izolatları yavaş üreme, hareket kaybı ve pigment üretiminin kaybolması gibi fenotipik değişiklikler gösterebilmektedirler. Bu nedenle, KF hastalarının kültürlerinin beş güne kadar izlenmesi gerekmektedir (27).

Bahsedilen konvansiyonel yöntemlere ek olarak ticari olarak geliştirilmiş manuel ve otomatize sistemler de mevcuttur. Manuel sistemler *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, mukoid izolatlar da dahil olmak üzere doğru tanı verebilmektedirler. Manuel sistemler, KF hastaları için otomatize sistemlere göre daha çok tercih edilmektedirler. Otomatize sistemler KF dışı hastaların *P. aeruginosa* suşlarını %90-100 doğrulukla saptayabilmektedirler (27).

#### 2.1.7.4. Tiplendirme Yöntemleri

Fenotipik özelliklerin temel alındığı konvansiyonel yöntemler lipopolisakkarid (LPS) serotiplendirme ve faj tiplendirme (27). *P. aeruginosa*, 20 serotip altında gruplandırılmaktadır ve KF hastalarında izole edilenler haricinde suşların %90'ı O serotiptir (6).

Epidemiyolojik amaçlı tiplendirme için çeşitli genotipik tiplendirme yöntemleri mevcut olmakla birlikte çoğu klinik tanı laboratuvarında bulunmaması nedeniyle kullanımları oldukça kısıtlıdır (27).

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), *P. aeruginosa* ekzotoksin A geninin üst bölgesindeki çeşitliliği temel alan bir yöntemdir. Pilin geninin RFLP incelemesi de KF hastalarını enfekte eden suşların tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Diğer genotipik yöntemlere göre daha az ayırıştırıcı güce sahip olması, yoğun radyoaktif prob kullanılması ve emek yoğun bir yöntem olması dezavantajlarıdır (46).

Değişken alanlı jel elektroforezi (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), *P. aeruginosa* için çok iyi ayırım gücüne sahiptir ve moleküler yöntemler içinde altın standart olan yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajları ise özel ekipmana ihtiyaç duyulması ve çok sayıda izolatin hızlı değerlendirilebilmesi için uygun olmayışıdır (6,27,46).

Rastgele arttırılmış polimorfik DNA analizinin (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*, RAPD), *P. aeruginosa* tiplendirmesi için güvenilirliği kanıtlanmıştır; ancak sürekli aynı ekipmanın kullanılması ile tekrarlanabilirliği mümkün olmaktadır. RAPD yöntemi ile elde edilen veriler genellikle PFGE ile uyumlu olmaktadır (27).

Multilokus sekans tiplemesi (*Multilocus sequence typing*, MLST), genetik tiplendirme yöntemleri içinde en yüksek ayırıştırma gücüne sahip olan ama çok fazla zaman harcanan ve pahalı olan bir yöntemdir (27).

### **2.1.8. Enfeksiyonlarının Tedavisi**

Pek çok antibakteriyel ajana direnç geliştirebilmesi nedeniyle, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça güçtür. Geniş spektrumlu penisilinler (azlosilin, mezlosilin, tikarsilin, piperasilin), üçüncü kuşak sefalosporinler (sefaperozon, seftazidim), karbapenemler (imipenem, meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (amikasin, gentamisin), florokinolonlar (siprofloksasin) ve polimiksinler (polimiksin B ve kolistin) *Pseudomonas* türlerine oldukça etkili antibiyotiklerdir. Tedavide önerilen aminoglikozidlerin beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilerek verilmesidir. Monoterapinin de antimikrobiyal ajanın erken ve uygun dozda verilmesi ile etkin olabileceği bilinmektedir (6,7).

*P. aeruginosa*'nın direnç oranlarının son yıllardaki artışı, tedavinin antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre hastaya özel olarak planlanmasını gerektirmektedir. Günümüzde bu tür dirençli mikroorganizmalara etkili olabilecek yeni ajanların geliştirilmesine yönelik çabalar henüz başarılı olamamıştır. Polimiksinler gibi eski ve iyi bilinen ilaçların kullanımı gündeme gelmiştir. Gelecekte kullanılması muhtemel tedavi seçenekleri arasında antimikrobiyal ajanın devamlı infüzyonu ve immünoterapi yer almaktadır (10).

### 2.1.9. Antimikrobiyal Direnç

*Pseudomonas aeruginosa*, tüm dünyada nazokomiyal enfeksiyonların %10-15'inden sorumlu tutulmaktadır. Antimikrobiyal ajanların bir kısmına doğal dirençli olması ve bunun yanı sıra sonradan direnç kazanabilmesi nedeniyle, enfeksiyonlarının tedavisi ciddi bir klinik problem haline gelmektedir (3). Antipsödomonal ajanlara direnç oranı, 2001 yılında %12 olarak rapor edilmiştir (6, 47). Avrupa'da yapılmış çalışmalarda da benzer sıklıkta dirençle karşılaşılmasına karşın; Güney Avrupa, Güneydoğu Asya, Güney Amerika ülkelerinde %50 gibi çok yüksek oranlarda antipsödomal direnci bildirilmektedir (6). Ülkemizde yanık hastalarında yapılmış bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %22'sinin seftazidime, %25'inin sefepime, %31'inin piperasilin/tazobaktama, %46'sının imipeneme, %19'unun meropeneme, %36'sının gentamisine, %21'inin amikasine %25'inin siprofloksasine dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu izolatların %43'ünün ise çoklu ilaca dirençli olduğu rapor edilmiştir (48).

*Pseudomonas aeruginosa*'nın kullandığı direnç mekanizmaları şu şekilde gruplandırılabilir:

- i. Hücre duvarı geçirgenliğinin azalması (intrensek direnç sağlar),
- ii. Kromozomal veya plamid aracılı ekstraselüler enzimlerin üretimi (beta laktamazlar, sefalosporinazlar, aminoglikozidazlar),
- iii. Antibiyotik bağlayan protein bölgelerinde değişiklik,
- iv. Aktif eflüks sistemi ile antibiyotiğin hücreden dışarı pompalanması (6).

#### 2.1.9.1. Aminoglikozidlere Direnç Mekanizmaları

Plazmidlerce kodlanan aminoglikozid mofiyeden enzimler (AME), antibiyotik molekülüne fosfat, adenil veya asetil gruplarından birini eklemek suretiyle antibiyotiğin hedef moleküle olan affinitesini azaltmaktadırlar (3,49). AME'ler; aminoglikozid fosforil transferazlar, aminoglikozid adeniltransferazlar (nükleotidil transferazlar; AAD, ANT) ve aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (50-52). *P. aeruginosa*'da görülen aminoglikozid transferazlar ise şunlardır;

- i. ACC(6')-II: gentamisin, tobramisin ve netilmisin,
- ii. ACC(3)-I: gentamisin,
- iii. AAC(3)-II: gentamisin, tobramisin ve netilmisin,

- iv. AAC(6')-I: tobramisin, netilmisin ve amikasin,
- v. ANT(2')-I: gentamisin ve tobramisin direncinden sorumludur (51).

Eflüks sistemi aminoglikozid direncinde *P. aeruginosa*'nın kullandığı mekanizmalardandır. Membran geçirgenliğinde azalmaya bağlı aminoglikozid direnci, KF hastalarından izole edilen suşlarda sıklıkla görülmektedir (3,51,52).

Çoğunlukla aktarılabilen plazmidler üzerinde yer alan transpozonlar tarafından kodlanan 16S rRNA metilazlar gram negatif patojenlerde aminoglikozid direncine sebep olmaktadır (3,51,52). 2003'de Japonya'da *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmış olan RmtA, ilk tanımlanan 16S rRNA metilazdır (53). Amikasin, tobramisin, isepamisin, kanamisin, arbekasin ve gentamisin de dahil olmak üzere parenteral kullanılabilen tüm aminoglikozidlere yüksek düzey dirençten sorumludur (3,53).

Ayrıca *P. aeruginosa*'da enzimatik olmayan çeşitli mekanizmalarla aminoglikozid direncine neden olan ve *galU*, *nuoG*, *mexZ* ve *rplY* olarak adlandırılan dört gen tanımlanmıştır (3,54).

### 2.1.9.2. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları

*Pseudomonas aeruginosa*'nın kinolonlara direnç geliştirmesinde, eflüks sisteminin aktivasyonu ya da florokinolonların temel hedefi olan DNA girazın (topoizomeraz II) modifikasyonu rol almaktadır. DNA giraz enziminin modifikasyonundan, kinolon direnci belirleyici bölgede (*Quinolone-Resistant-Determinative Region*, QRDR) bulunan *gyrA/gyrB* genlerinde meydana gelen nokta mutasyonları sorumludur. Enzimde meydana gelen modifikasyon sonucunda topoizomeraz II enziminin kinolon molekülüne affinitesi azalmaktadır (3,56-59).

*Pseudomonas aeruginosa*'da, dört farklı eflüks sistemi tanımlanmıştır: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM. Her ne kadar her bir eflüks pompa sistemi farklı antimikrobiyal ajanları substrat olarak kullansa da florokinolonlar bu dört sistem için üniversal substrattır (3,56).

### 2.1.9.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Penisilinin 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfinin ardından klinikte kullanımı 1940'larda mümkün olmuştur. Bu gelişmeler beta laktamların antimikrobiyal

etkinliği üzerine dikkatleri toplamış ve bu konuda çalışmalar artmıştır. 1967 yılında karbenisilin keşfedilmesiyle beta laktam analoglarının *P. aeruginosa* üzerinde etkili olduğu fark edilmiş ve daha sonraki yıllarda antipsödomal etkinliği olan pek çok beta laktam türevi klinik kullanıma girmiştir (61).

Sokak suşu olarak adlandırılan, hiç direnç kazanmamış bir *P. aeruginosa* izolatlarının, karboksipenisilinlere (karbenisilin, tikarsilin), üreidopenisilinlere (azlosilin, piperasilin), bazı üçüncü kuşak sefalosporinlere (seftazidim, sefaperazon), tüm dördüncü kuşak sefalosporinlere, monobaktama (aztreonam), karbapenemlere (imipenem, meropenem) duyarlı olması beklenmektedir. Penisilin G'ye, aminopenisilinlere ve bunların beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına; birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere doğal dirençlidir (3,62).

İntrensek karbenisilin direnci olarak adlandırılan fenotip, meropenem de dahil olmak üzere (imipenem hariç) pek çok beta laktamın minimal inhibitör konsantrasyonunda (MİK) dört ila sekiz kat artış ile karakterizedir. Kromozomal AmpC beta laktamaz üretimi azami düzeyde dahi yoktur. Bu fenotip, kinolonlar, trimetoprim, tetrasiklin ve kloromfenikol gibi beta laktam olmayan antibiyotiklere de direnç sağlamaktadır. MİK düzeyindeki artış, diş memran geçirgenliğinin azalması ile birlikte eflüks isteminin aktivasyonu veya depresyonuna bağlıdır (62).

İkinci fenotip ise karbapenemler ve sefemler (sefepim ve sefpirom) dışındaki tüm beta-laktamları etkilemektedir. AmpC beta-laktamaz depresyonu sonucu meydana gelmektedir (63).

Üçüncü fenotip; OXA tipi beta laktamazların üretimi sonucu sefalosporinlerden çok penisilin (özellikle tikarsilin, azlosilin ve piperasilin) direncine neden olmaktadır. Dar spektrumlu OXA tipi beta laktamazlar, karboksipenisilinlere ve üreidopenisilinlere dirençten sorumludur. Fakat geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonam ve moksalaktam bu enzimlerden etkilenmemektedir (62).

Dördüncü fenotip ise karbapenemlerin MİK'lerinde artış ile karakterize olup, Karbapenem spesifik bir porin olan OprD düzeyinde artışa bağlıdır. Bu nedenle diğer beta-laktamlar bu direnç mekanizmasından etkilenmemektedirler (64).

Bunların dışında plazmid ya da integron aracılı geniş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) üretimine bağlı direnç de görölmektedir (3).



### 2.1.9.3.1. Aktif Eflüks Sistemi ve Dış Membran Geçirgenliğinde Azalma

*Pseudomonas aeruginosa*'nın beta laktam direncinde rol alan nonenzimatik nedenlerden en önemlisi eflüks sistemidir. Ayrıca tüm antipsödomonal antibiyotiklere çoklu dirençten sorumludur. Direnç gelişimde üç komponentten oluşan ve genetik olarak farklı dört eflüks sistemi rol almaktadır. Bunlar: MexA–MexB–OprM, MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN ve MexX–MexY–OprM'dır (51,52,65-67).

Bu sistemin ilk komponentini oluşturan MexB, MexD, MexF ve MexY proteinleri sitoplazmik membranda yer almaktadır. Geniş bir substrat profiline sahip olan bu pompa enerji bağımlı olarak çalışmaktadır. İkinci komponenti; dış membran proteini olan OprM, OprJ, OprN ve OprM' den oluşmaktadır. Üçüncüsü ise periplazmik aralıkta bulunan MexA, MexC, MexE ve MexX proteinlerinden oluşmaktadır ve diğer iki sistemi birbirine bağlamaktadır. Bahsedilen eflüks sistemlerinin yapısı ve substrat özellikleri Tablo 4'de verilmiştir (3).

**Tablo 4. *P. aeruginosa*'da bulunan eflüks sisteminin yapısı ve substrat özellikleri, (3).**

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

*Pseudomonas aeruginosa*'da meydana gelen mutasyonlar nedeniyle eflüks isteminin aşırı ekspresyonu antipsödomonallere dirençte etkili olmaktadır. Artmış OprF ekspresyonu beta laktam ve kinolon MİK'lerinde düşük oranda etkili olmaktadır. Geçirgenlikle ilgili mutasyonlar özellikle karbenemlere dirençte önem kazanmaktadır ki; OprD kaybından karbapenemler etkilenirken diğer beta laktamlar etkilenmemektedir. Mutasyon neticesinde ortaya çıkan geçirgenlik azalmasından meropenem, imipeneme göre daha az

etkilenmektedir. Bu nedenle imipenem direnci ve meropenem azalmış duyarlılık görülmektedir. OprD porin proteinin kaybına bağlı gelişen karbapenem direncinin, sadece kromozomal AmpC tipi betalaktamaz üreten izolatlarda görülmesi dikkat çekici olup; iki direnç mekanizması arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir (51,52,66-70).

### **2.1.9.3.2. Beta Laktamların Hedeflerinde Değişiklik**

Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik, *P. aeruginosa*'da beta laktam direncine sebep olan nadir mekanizmalardandır. PBP-3s ve PBP-4s ile ilişkilendirilmiş beta laktam dirençli *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir (3,62).

### **2.1.9.3.3. Beta Laktamazlar**

Beta laktam direncinin en yaygın nedeni olan beta laktamazlar; kromozomal, plazmid veya tranpozonlarca kodlanabilen enzimlerdir. Yapısal olarak ya da induksiyon sonucu sentezlenebilmektedirler. Gram negatif bakteriler tarafından periplazmik boşluğa; gram pozitif bakterilerde ise hücre dışına salınmaktadırlar. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides vulgatus* gibi türlerde ise hücre membranına bağlı enzimler bildirilmiştir (71).

Beta laktamazlar olarak bahsedilen penisiloyl-serin transferaz enzimleri, aktif bölgelerinde genellikle serin bulunan proteaz süper ailesinde yer almaktadır (3,71). Bu enzimler, ilk olarak antibakteriyal ajana nonkovalent olarak bağlanarak miçel kompleksi oluşturmaktadırlar. Enzimin aktif kısmındaki serin rezidüsünde bulunan serbest hidroksil ucu ile beta laktam halkasının bağlanması sonucu kovalent bir açil grubu oluşmaktadır. Oluşan açil grubunun hidrolizi ile antimikrobiyal ajan inaktive edilmektedir (63).

Üçyüzden fazla beta laktamaz tespit edilmiş olup beta laktamazların nükleotid ve aminoasit dizilimlerini temel alan moleküler sınıflandırması 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Günümüzde ise enzimin substrat ve inhibitör profilleri dikkate alınarak Bush tarafından yapılmış fonksiyonel bir sınıflama da (bakınız Tablo 5) mevcuttur (3,47,61).

**Tablo 5. Beta laktamazların sınıflandırması, (47).**

Fonksiyonel Sınıflama	Ambler Sınıflaması	Bush Sınıflaması	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 sefaloporinler (sefazolin, sefuroksim vb)
		2be	Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL): TEM ve SHV	Metisilin, oksasilin ve kloksasilin ile birlikte geniş spektrumlu beta laktamazların substratları TEM ve SHV ile aynı
		2br	Diğerleri: BES-1, GES/IBC, PER-1, PER-2 SFO-1, TLA-1, VEB-1/2	
		2e	TEM (TEM-30, TEM-31) CTX	TEM ve SHV ile aynı GSBL'ların substratları ve bazı enzimler için sefepim
		2f	Karbapenemazlar: KPC-1, KPC-2, KPC-3, GES-1, GES-2	Karbapenemler, sefamisinler ve GSBL'lerin substratları
Metallo beta laktamazlar	Sınıf B Metallo Beta Laktamazlar	3a, 3b, 3c	Karbapenemazlar: IMP, VIM, SPM-1, SPM-2, GIM-1, L1, CcrA	Sınıf A karbapenemazlarla aynı
Serin beta laktamazlar	Sınıf C - sefalosporinazlar	1	AmpC tipi: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY, DHA-1, DHA-2, FOX, LAT, MIR-1, MOX-1, MOX-2	Sınıf A karbapenemazlarla aynı
Serin beta Laktamazlar	Sınıf D – Kloksasilin hidrolize eden enzimler (OXA)	2d	OXA'ların çoğu	Kloksasilin, metsilin ve oksasilin ile birlikte geniş spektrumlu penisilinler
			Diğer: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48	IMP, VIM, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 ile aynı
Bilinmeyen		4	AVS-1	Herhangi bir fonksiyonel ya da moleküler sınıfa dahil edilememiştir

Sınıf A, C ve D beta laktamazların aktif kısımlarında serin aminoasidi bulunmaktadır; Sınıf B beta laktamazların (metallo beta laktamazlar, MBL) aktiviteleri ise çinko iyonuna bağımlıdır (49).

### 2.1.9.3.3.1. AmpC Beta Laktamaz

AmpC beta laktamazlar, *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'da tanımlanmış sefalosporinazlardır. Penisilinlerin pek çoğu, dar spektrumlu sefalosporinler ve beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına intrinsek dirençten sorumlu tutulan enzimlerdir. *E. coli*'de bulunan kromozomal AmpC indüklenebilir değildir. Pek çok *Enterobacteriaceae* türünde ve *P. aeruginosa*'da bulunan AmpC için ise özellikle karbapenemler kuvvetli indükleyicidir. Piperasilin, seftazidim ve sefepim gibi antipsödomonaller AmpC hidrolizine duyarlı ve AmpC için zayıf indükleyicidirler. Antipsödomonal etkinlik gösteren beta laktamların uzun süreli kullanımı aşırı AmpC üretimi olan mutant suşların seleksiyonuna sebep olarak tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Son zamanlarda; imipenem, seftazidim ve sefepime orta duyarlılık gösteren klinik *P. aeruginosa* suşlarında geniş spektrumlu AmpC varlığı bildirilmiştir. Plazmidlerce kodlanan sefalosporinazların moleküler yapısı *P. aeruginosa*'nın sefalosporinazı ile benzerdir. Ancak *Enterobacteriaceae*'nın aksine *P. aeruginosa*'da plazmid kökenli bir sefalosporinaz henüz tespit edilmemiştir (63,72,73).

### 2.1.9.3.3.2. Sınıf A Karbenisilin Hidrolize Eden Beta Laktamazlar

*Pseudomonas aeruginosa*'da karbenisilin hidrolizinden sorumlu dört *Pseudomonas* özgül enzim tipi (*Pseudomonas Specific Enzyme*, PSE) belirlenmiştir: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 ve CARB-4 (3,72). Bu enzimlerin substratı olan beta laktamlar karboksipenisilinler, üreidopenisilin ve sefsulodindir. Bu enzimler moleküler sınıf A'da ve fonksiyonel sınıf 2b'de yer almaktadırlar (72,74). Karbenisilinaz üreten suşlar; sefepime, sefpiroma ve aztreonama değişik duyarlılık özellikleri gösterirken seftazidime ve karbapenemlere %100 duyarlılık göstermektedirler (3).

### 2.1.9.3.3.3. Sınıf A Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL'ler) penisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlerin yanı sıra geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı da hidrolize etmektedirler. Ancak sefamisinleri ve karbapenemleri hidrolize edememektedirler ve

klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmektedirler (72-75). *P. aeruginosa*'da tespit edilmiş Sınıf A GSBL tipleri Tablo 6'da özetlenmiştir (3).

**Tablo 6. *P. aeruginosa*'da tespit edilen Sınıf A GSBL tipleri, (3).**

Enzim	Kodlayan Genin Lokalizasyonu	İlk İzolasyon Yılı	İlk İzole Edilen Ülke	Diğer İzolasyon Bölgeleri
SHV-2a	K, P	1995	Fransa	Tayland, Polonya
SHV-5	P	1994-1996	Tayland	Yunanistan
SHV-12	K	1994-1996	Tayland	Yunanistan
TEM-4	P, K	1996	Fransa	
TEM-21	K	1997	Fransa	
TEM-24	P	1998	Fransa	
TEM-42	P	1992	Fransa	
TEM-116	Bilinmiyor	2004-2006	Fransa	
VEB-1	K, P, İ	1998	Fransa	Tayland, Hindistan, Çin, Bulgaristan
VEB-1a	K, İ	1999	Kuvveyt	Hindistan
VEB-1b	K, İ	1999	Kuvveyt	
VEB-2	K, İ	1999	Tayland	
PER-1	K	1991	Fransa	Türkiye, İtalya, Belçika, Polonya
GES-1	P, İ	1999	Fransa	Brezilya
GES-2	P, İ	2000	Güney Afrika	
GES-5	P, İ	2004	Fransa	Güney Afrika
GES-9	P, İ	2004	Fransa	
IBC-2 (GES-8)	K, İ	1998	Yunanistan	
BEL-1	K, İ	2004	Belçika	

K: Kromozomal kodlanan, İ: İntegron kökenli, P: Plazmid kökenli

#### 2.1.9.3.3.4. Sınıf D Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (Oksasilinazlar)

Klasik oksasilinazlar (OXA-1, OXA-2, OXA-10) karbenisilin ve üreidopenisilinlere dirençten sorumludur ve seftazidimi etkilememektedirler (74,76-78). OXA-2 üretimine bağlı ortaya çıkan pipersilin ve tikarsilin direnci OXA-1 ve OXA-10 üretimine bağlı dirençten daha düşük orandadır (3,72). Seftazidim hidrolize edebilen oksasilinazlar; aynı zamanda sefotaksim, sefepim, sefpirom, aztreonam ve moksalaktamı da hidroliz edebildiklerinden klinik öneme sahiptirler. Karbapenem direncine yol açmazlar (74,76-78). OXA-18 ve OXA-45 dışında oksasilinaz enzimleri klavulanik asit veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler (3,72).

*Pseudomonas aeruginosa*' da sıklıkla tespit edilenler sefotaksim, seftazidim ve aztreonam direnci ile ilişkilidir. OXA-10 derivesi olan OXA-11, *P.aeruginosa*'dan ilk

izole edilen oksasilinazdır ve 1991’de Türkiye’den kan akımı enfeksiyonu etkeni olan bir suşta bildirilmiştir (74,76-78). *P. aeruginosa*’da saptanan oksasilinazlar şunlardır: OXA-14 ila OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-45, OXA-128, OXA-129, OXA-141, OXA-142, OXA-147 (3,72).

### 2.1.9.3.3.5. Karbapenemazlar

Kromozomal olarak kodlanabildiği gibi plazmid ya da integron kökenli de olabilen karbapenemazlar, imipenem ve/veya meropenemi hidrolize eden beta laktamazlardır (72,75).

Sınıf A karbapenemazlar KPC olarak tanımlanmıştır ve tüm dünyada en sık karşılaşılan tiptir. *Enterobacteriaceae* türleri arasında yaygındır. *P. aeruginosa* izolatlarında ise sporadik olarak görülmektedir (75). Penisilinler, sefalosporinler ve aztreonam dahil olmak üzere çok sayıda beta laktamı hidrolize edebilmektedirler. Klavunat ve tazobaktamla inhibe olmaktadır (72-74,79). Bu güne kadar tespit edilmiş olan sınıf A karbapenemazlar:

- i. SME (Serratia marcescens enzyme),
- ii. IMI (imipenem-hydrolyzing beta-lactamase),
- iii. NMC-A (not metalloenzyme carbapenemase),
- iv. GES (Guiana extended spectrum),
- v. KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase),
- vi. SHV-38,
- vii. SFC-1’dir (72-74,79).

Bu güne kadar *P. aeruginosa*’da tanımlanmış sınıf A karbapenemazlar; GES-2, GES-5, KPC-2 ve KPC-5’dir. GES, aslında GSBL tipi beta laktamazlar sınıfında tanımlanmıştır ama bazı varyantları karbapenemleri de hidrolize edebilmektedir (73,74,79).

Sınıf D karbapenemazlar karbapenemleri zayıf hidrolize etmektedirler ve OXA-50 dışındaki tipleri *P. aeruginosa*’da nadiren tanımlanmıştır. OXA tipi karbapenemazlar sıklıkla *Acinetobacter baumannii*’de (*A. baumannii*’de) bildirilmiştir ve genellikle kromozomaldır. Ancak *Enterobacteriaceae*’da plazmid kökenli OXA-23 ve OXA-48 bildirilmiştir (79-82).

*Pseudomonas aeruginosa*'da enzimatik karbapenem direncinde rol oynayan en önemli mekanizma Sınıf B karbapenemazlardır (metallo beta laktamazlar, MBL) ve çoğunlukla kazanılmış dirençten sorumludur (73,79-82).

## 2.2. Metallo Beta Laktamazlar

Metallo beta laktamazlar, 1960'ların ortalarında yani serin beta laktamazların tespitinden yaklaşık 25 yıl sonra ilk kez patojenitesi düşük bir bakteri türünde saptanmıştır. 1990'lı yıllarda bu enzimlerin aktarılabilen genetik materyaller aracılığıyla gram negatif patojenler arasında taşındığı fark edilmiştir. Günümüzde MBL üreten karbapenem dirençli bakterilerin tüm dünyada yaygınlaşmasıyla MBL'lerin klinik önemi artmıştır (11,83).

Metallo beta laktamazlar gerek yapısal olarak gerekse fonksiyonel olarak diğer beta laktamazlardan farklıdır. Klinik suşlarda genellikle ikinci veya üçüncü bir beta laktamaz enzimi ile birlikte salınması, diğer beta laktamazlardan bir başka farkıdır. Yapısal farklılıkları aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurmalarından kaynaklanmaktadır. İşlevsel farklılıkları ise monobaktamlar için zayıf hidrolitik kapasiteleri olması ve klavulanik asitle veya tazobaktamla inhibe olmamalarından kaynaklanmaktadır. Beta laktamaz inhibitörleri yerine EDTA, dipikolinik asit ya da 1,10-fenantrolin gibi metal şelatörlerle inhibe olmaktadır (9,11-13,74,83).

### 2.2.1. Sınıflandırma

Beta laktamazların yapısal sınıflandırmasında sınıf B'de bulunmaktadır. Bu enzimlerin, Tablo 7'de görüldüğü gibi; imipenem ve diğer beta laktamları hidroliz özelliklerini temel alan işlevsel sınıflaması (3a, 3b ve 3c) yapılmıştır (9,11-13,70).

**Tablo 7. Metallo betalaktamazların sınıflandırılması (12,74,79).**

Fonksiyonel Altgrup	Yapısal Alt sınıf	Örnekler	Etki Spektrumu	Protein Bağlayan Ligant	
Grup 3a	B1	Bc-II, IMP-1, Ccr A, VIM, GIM, SPM-1	Geniş spektrumlu	Histidin-histidin-histidin	Asparajin/arjinin/sistin-sistin-histidin
	B3	LI, FEZ-1, Gob-1, CAU-1	Sefalosporin hidrolizi için yüksek özgüllük	Histidin/ glisin-histidin-histidin	Asparajin/histidin-serin-histidin
Grup 3b	B2	Cph A, Sfh-1	Karbapenem hidrolizi için yüksek özgüllük	Asparajin-histidin-histidin	Asparajin/arjinin-sistin-histidin

Zn: Çinko

Grup 3a enzimleri imipenemi hidroliz ettikleri hızda ya da daha hızlı bir şekilde penisilinleri de hidroliz edebilmektedirler. Geniş bir etki spektrumuna sahiptirler ve imipenem kadar olmasa da yüksek özgüllükte sefalosporin hidrolizi yapmaktadırlar. Nonfermantatifler ve *Enterobacteriaceae*'da sıklıkla saptanan ve tüm dünyada görülmekte olan VIM ve IMP tipi enzimler bu grupta yer almaktadır. Plazmidlerce kodlanan bu enzimler aminoasit dizilimine göre ise moleküler sınıf B1'de yer almaktadırlar. Grup 3b enzimleri yüksek özgüllükte karbapenem hidrolizi yapmaktadırlar. Grup 3c ise yüksek sefalosporinaz aktivitesine göstermektedirler (12,83).

### 2.2.2. Genetik Özellikleri

Çevresel kaynaklı bazı mikroorganizmalar kromozomal olarak MBL taşımaktadır. Bu bakteriler çoğunlukla oportunistik patojenler ya da *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus anthracis*, *Bacteriodes* spp. dışındakiler nadiren ciddi enfeksiyona neden olmaktadır (9,12). Kromozomal olarak MBL kodlayan bakterilere verilebilecek örnekler şunlardır: *Bacillus cereus* (BC II), *Bacillus anthracis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB ya da GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) (84-94).

Hepsi değilse bile VIM, IMP, GIM tipi MBL enzimlerinin pek çoğunu kodlayan genler klas 1 integronların gen kasetlerinde saptanmıştır. IMP tipi MBL'yi kodlayan genler

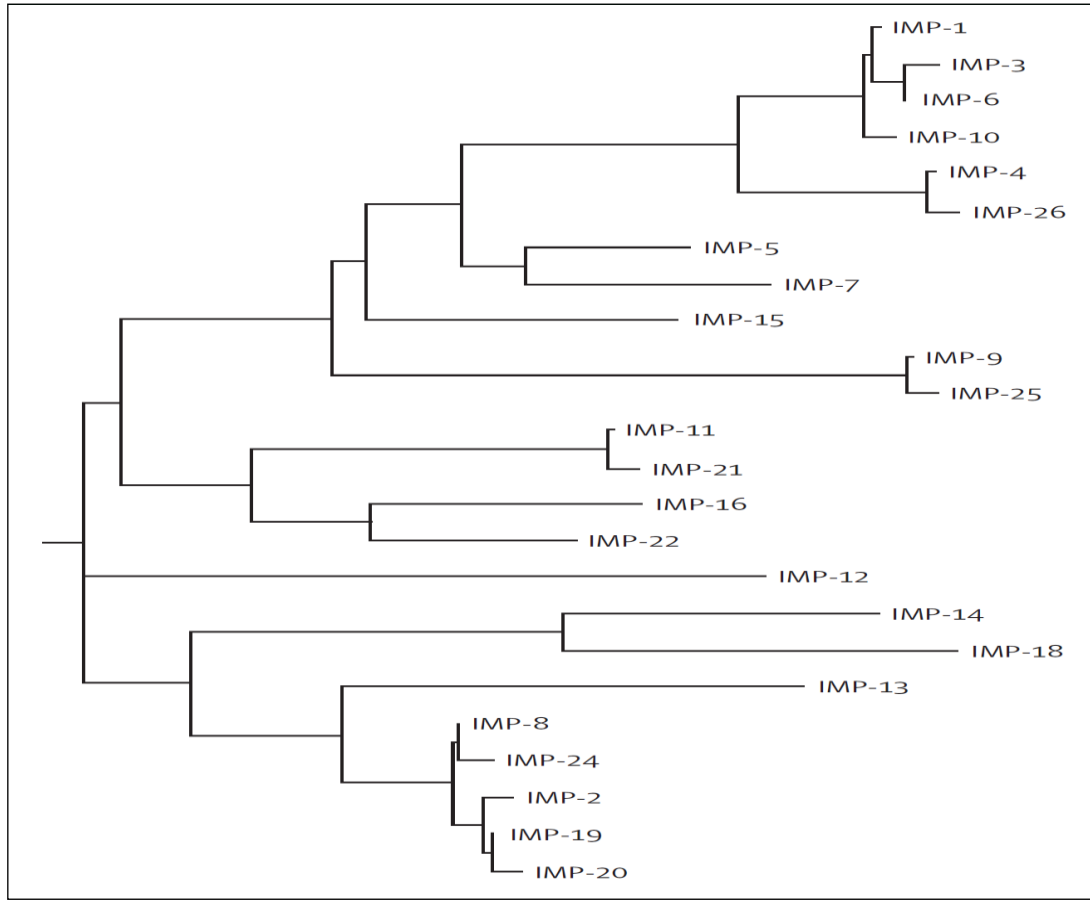


ayrıca klas 3 integronda da bulunmuştur (95-98). Genellikle MBL kodlayan genler; kanamisin, neomisin, amikasin ve streptomisin direncini kodlayan *aacA4* geni ile birlikte taşınmaktadır. Beta laktam ve aminoglikozid dirençlerini taşıyan gen kasetleri farklı integronlar arasında geçiş yapabilmektedirler. Ancak bir organizmadan diğerine aktarılmaları için transpozon ya da plazmidlere ihtiyaç duymaktadırlar. Çoğunlukla MBL geni taşıyan plazmidler yaklaşık 120-180 kb uzunluğundadır (99-102). Ancak tüm MBL genleri integronlar ya da plazmidlerle ilişkili olmak zorunda değildir. SPM-1 enziminin, integron veya transpozonlar ile ilişkisi olmayan ve 180 kb büyüklüğünde bir plazmitte taşınan gen tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (103).

### **2.2.3. Metallo Beta Laktamaz Tipleri**

#### **2.2.3.1. IMP Tipi Metallo Beta Laktamazlar**

IMP-1, ilk kez 1988'de Japonya'da *P. aeruginosa* GN17203 suşunda saptanmıştır ve bu genin konjugatif bir plazmit tarafından kodlandığı belirlenmiştir (104). Sonraki yıllarda dünyada pek çok ülkeden ve 20'den fazla IMP varyantı rapor edilmiştir (Şekil 2). IMP-1, IMP-4 ve IMP-7 değişik coğrafi bölgelerde yaygın olarak bulunmasına karşın bazı IMP tipleri belirli coğrafi bölgelerde sınırlı kalmıştır. IMP varyantları arasında kinetik farklılıklar görülmektedir ancak bu farklılık klinik tabloya önemli derecede yansımamaktadır (9,11-13).



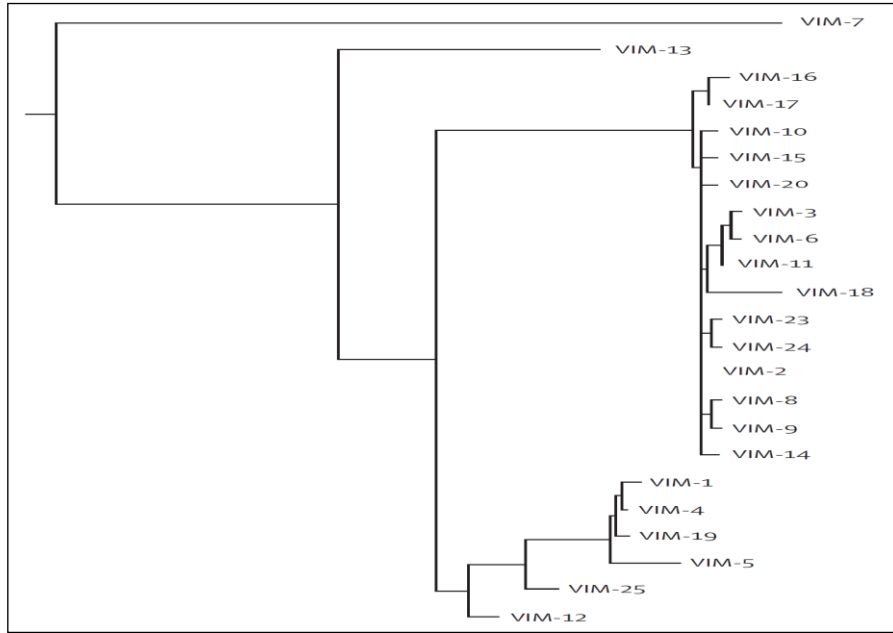
**Şekil 2. IMP tipi MBL'lerin filogenetik ilişkisi, (26).**

Bu güne kadar *P. aeruginosa*'da saptanan IMP varyantları şunlardır: IMP-1 (Japonya, Brezilya, Kore), IMP-2 (Japonya), IMP-6 (Japonya), IMP-7 (Kanada, Malezya), IMP-9 (Çin), IMP-10 (Japonya), IMP-11 (Japonya), IMP-13 (İtalya), IMP-14 (Tayland), IMP-15 (Meksika), IMP-16 (Brezilya), IMP-18 (ABD), IMP-20 (Japonya), IMP-21 (Japonya), IMP-22 (Avusturya), IMP-25 (Çin), IMP-26 (Singapur). Bu enzimlerin genellikle klas 1 integronlarla ya da klas 3 integronlarla kodlandığı tespit edilmiştir (26, 29).

### 2.2.3.2. VIM Tipi Metallo Beta Laktamazlar

VIM tipi enzimler IMP tipi beta laktamazlarla aynı antibiyotik etki spektrumuna sahiptir ancak yapısal olarak %40'ın altında amino asit benzerliğine sahiptirler (9,12,13). VIM-1 (Verona imipenemaz) ilk kez İtalya'da *P. aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir (95). Daha sonra bu enzimin klas 1 integronunda yer alan gen tarafından kodlandığı saptanmıştır

(105). Sonraki yıllarda aynı şehirden *Achromobacter xyloxidans* ve *Pseudomonas putida* gibi ve farklı ülkelerden *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) ve *E. coli* gibi farklı türlerde de bu enzim tespit edilmiştir. Günümüzde 20 den fazla VIM tipi metallo beta laktamaz saptanmış olup sadece Avrupa ülkelerinden değil tüm dünyadan rapor edilmektedir (Şekil 3) (9,11-13).



**Şekil 3. VIM tipi MBL'lerin filogenetik ilişkisi, (26).**

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

### 2.2.3.3. SPM-1

Brezilya'nın Sao Paulo şehrinde ilk kez 1997'de izole edilen yeni bir MBL türü olan SPM-1, sekans analizi sonuçlarına göre IMP-1 enzimi ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. SPM-1 bu güne kadar sadece *P. aeruginosa* türlerinden izole edilmiş olup Brezilya'da sınırlı kalmıştır (106,107).

### 2.2.3.4. GIM-1

Almanya'da 2002 yılında farklı hastalardan izole edilmiş beş *P. aeruginosa* izolatında yeni bir MBL türü saptanmış ve GIM-1 olarak isimlendirilmiştir (108). Amino asit sekans analizine göre IMP-6, IMP-1 ve IMP4 ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. GIM-1 enzimini kodlayan gen, 45 kb büyüklüğünde küçük bir plazmid üzerinde yer alan klas 1 integron aracılığıyla taşınmaktadır. Sıklıkla bu gen aminoglikozid direncinden sorumlu olan *aacA4* gibi başka direnç genleri ile birlikte taşınmaktadır (9,12,13).

### 2.2.3.5. SIM-1

İlk kez Seul'de (Kore) karbapenem dirençli *Acinetobacter* spp.'de tespit edilmiştir. IMP tipi MBL' lar ile %64-69 oranında benzerlik gösteren bu enzimi kodlayan gen klas 1 integronda bir gen kasetinde yer almaktadır (12,13,109).

### 2.2.3.6. AIM-1

Avusturalya'da immünsüprese bir erkek hastadan izole edilen *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Bu enzimi ise 305 amino asitlik bir protein kodlayan 915 bp uzunluğunda bir gen tarafından kodlanmaktadır (110).

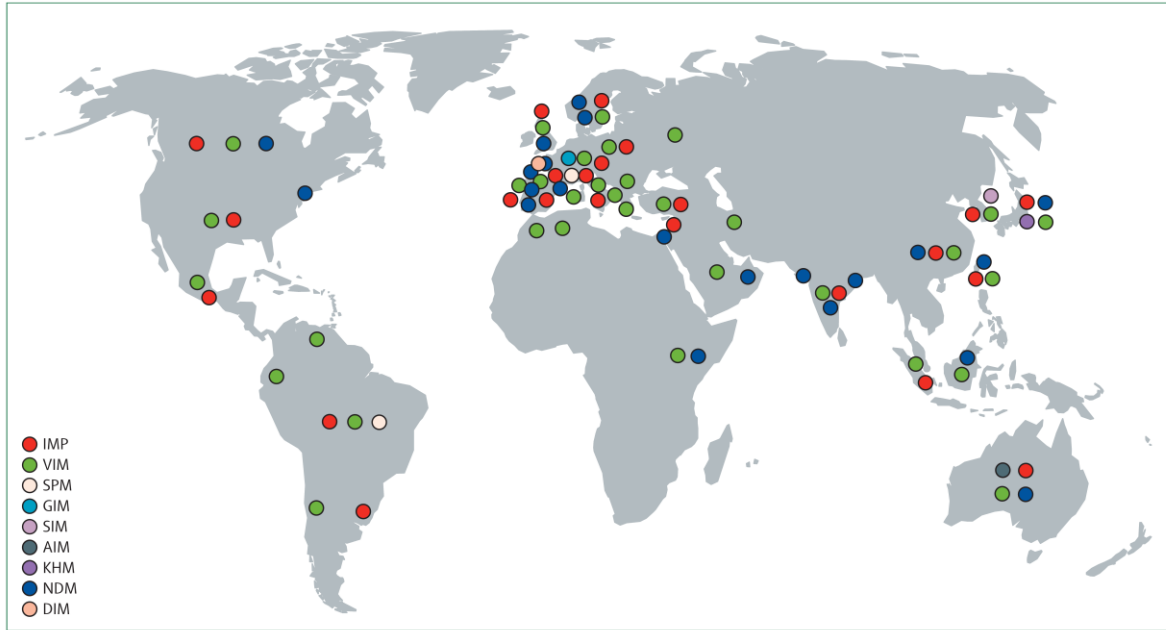
### 2.2.3.7. NDM-1

İlk kez 2008 yılında İsveç'ten Hindistan'a dönen bir hastadan izole edilmiş *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir (111). Bugün kıtalar arası yayılımın yüksek olması nedeniyle büyük endişe yaratmaktadır (11).

### 2.2.3.8. DIM-1

2009 yılında Hollandalı bir hastadan izole edilen *Pseudomonas stutzeri* izolatında saptanmıştır. GIM-1 ile %52'den az IMP-1 ile %45 den az oranda amino asit benzerliği göstermektedir. Bu enzim, 70 kb büyüklüğünde aynı zamanda aminoglikozid ve dezenfektan direncini de içeren klas 1 integron tarafından kodlanmaktadır (112).

### 2.2.4. Metallo Beta Laktamazların Epidemiyolojisi



Şekil 4. Çeşitli MBL tiplerinin dünya üzerindeki dağılımı, (26).

#### 2.2.4.1. Asya

*Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* izolatlarında saptanan IMP-1 ilk tespit edilen MBL türü olup Japonya'dan rapor edilmiştir (11,104,113). Sonrasında *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ve diğer nonfermantatiflerde değişik odaklardan MBL rapor edilmiştir. IMP'ye göre prevalansı daha düşük olan VIM tipi MBL'ler de tanımlanmıştır (11,114-116).

Kore'de ilk saptanan MBL varyantı olan VIM-2'nin, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* spp. arasında hızla yayılabildiği görülmüştür. Ülke

genelinde *Acinetobacter* ve *P. aeruginosa* türlerinde IMP tipi enzimler saptanabilmektedir (9,11,117).

Çin'den IMP-1, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter cloacae* türlerinde rapor edilmişken; IMP-8 ve IMP-9 ise *Acinetobacter* spp ve *P. aeruginosa* türlerinde bildirilmiştir. Çin'de *P. aeruginosa*'da bildirilen VIM tipi MBL sadece VIM-2'dir (11,118,119).

Tayvan'da yapılmış ilk taramalarda *Pseudomonas* türlerinde IMP-1, VIM-2, VIM-3 saptanmıştır (11,120). Hatta VIM-2 ve VIM-3 diğer nonfermantatiflerde de saptanabilmiştir (11,121). VIM-11 tüm nonfermantatiflerde ve *Enterobacteriaceae*'da tespit edilmiştir. (11,122).

Malezya'da ise *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında sırasıyla IMP-4 ve IMP-7 saptanmıştır (11,104,123). Ayrıca VIM-2 ve VIM-11' de bildirilmiştir (11,124).

Singapur'da ise *Pseudomonas* türlerinde IMP-1, IMP-6, IMP-7, VIM-2, VIM-6 ve IMP-26; *A. baumannii*'de VIM-4 bildirilmiştir (11,104,121,125).

Hindistan, Pakistan, Bangladeş gibi değişik ülkelere NDM-1 bildirilmektedir. VIM-2, VIM-5, VIM-6, VIM-11 ve VIM-18 ise *Pseudomonas* spp izolatlarında oldukça sık görülmektedir. Orta doğu ülkelerinden Sudi Arabistan ve İran'dan VIM geni taşıyan *P. aeruginosa* rapor edilmiştir (11,126-128).

#### 2.2.4.2. Avrupa

İlk MBL tespit edilen Avrupa ülkesi İtalya'da değişik bölgelerden IMP-2, IMP-12, IMP-13 VIM-1 ve VIM-14 rapor edilmiştir ve IMP-13 en yaygın görülen MBL'dir (11,126,130-132).

VIM tipi enzimlerin baskın olarak bulunduğu Yunanistan'da ise *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ve diğer nonfermantatiflerde VIM-1, VIM-2 ve VIM-4 hızla yayılmaktadır. Ayrıca VIM-12, VIM-17, VIM-19 rapor edilmektedir (4,11,104,133-39).

VIM-5 Türkiye'den bildirilen ilk MBL'dir ve *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'da saptanmıştır. Yine Türkiye' de ilk kez VIM-1 *K. pneumoniae* ve VIM-2 ise *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir. IMP-1 ise *E. cloacae* ve *P. aeruginosa*'da saptanmıştır (11,14,15,140-142).

Fransa'da ilk kez *P. aeruginosa*'da VIM-2 tespit edilmiştir ve *P. aeruginosa* izolatlarında yapılmış ulusal bir çalışmada VIM-2 ve IMP-18 tipi MBL'ler saptanmıştır (11,142,143).

İspanya'da VIM tipi enzimlerin hızla yayılmasına rağmen MBL prevalansı hala düşüktür (11,145). İsveç ve Norveç *P. aeruginosa* izolatlarında MBL sıklığı hızla artan ülkeler arasındadır. En sık görülen MBL tipleri VIM-2 ve VIM-4 olsa dahi IMP-14 de rapor edilmiştir (11,146,147).

*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında Almanya'da VIM-1, VIM-2, VIM-16; Avusturya'da ise IMP-13, IMP-22 gibi değişik MBL tipleri görülmektedir (11,148-151). Polonya'da ise VIM-2, VIM-4 ve IMP-7; Rusya'da VIM-2 tipi enzimler bildirilmiştir (11,104,152,153).

#### 2.2.4.3. Diğer Bölgeler

Brezilya'da gerek *Enterobacteriaceae*'da gerekse nonfermantatif gram negatif basillerde en yaygın olan SPM-1'dir. Ancak *P. aeruginosa*'da IMP-16 ve VIM-2 tipi MBL'ler saptanmıştır (11,154,155). Güney Amerika kıtasında yüksek oranda karbapenem direnci görülmesine rağmen ilginç bir şekilde MBL nadiren rapor edilmektedir. ABD'de MBL oldukça nadir görülmektedir (11). Kanada'da ise *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve IMP-7 tespit edilmiştir (11,156-158).

#### 2.2.5. Metallo Beta Laktamazların Klinik Önemi

*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae* ailesinin üyesi olan türlerde MBL üretiminin klinik olarak önem arz etmesinin en önemli nedeni bu genlerin aktarılabılır genetik materyaller ile taşınmasıdır (95-98,102,104). Geniş etki spektrumuna sahip olan bu enzimler, genellikle pek çok antibiyotik sınıfına yüksek oranda dirençli türlerde saptanmaktadır. Bu türlerde beta laktam direnci; sefalosporinaz enzimi üretimi, efluks pompa sistemi ve pek çok hidrofilik moleküle karşı membran geçirgenliğinde azalma ile ilgilidir. Bu kadar direnç mekanizmasını birlikte bulundurabilen bu mikroorganizmalar kolaylıkla çoklu ilaç direnci geliştirebilmektedirler. Geniş bir direnç profiline sahip olmalarına ek olarak bu enzimleri kodlayan genler, plazmidler aracılığıyla aminoglikozid direnç genleri gibi başka direnç genleri ile birlikte taşınmaktadırlar (9,104).

### 2.2.6. Metallo Beta Laktamazların Laboratuvar Tanısı

Bir mikroorganizmanın karbapenemaz ürettiğini düşündüren ilk bulgu artmış karbapenem MİK'idir. VIM, IMP, GIM, SIM ve SPM tipi MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem MİK'leri genellikle 8 µg/mL'den 128 µg/mL'nin üzeri gibi farklı değer aralıklarında olabilmektedir. Ancak bu enzimlere ait genler *E. coli* izolatlarında bulunduğu bu MİK değerleri 0.5 µg/mL gibi çok daha düşük değerlerde olabilmektedir. Bu durumdan da anlaşıldığı gibi *P. aeruginosa*'da karbapenem direncine efluks sistemi ya da membran geçirgenliğinin azalması gibi başka mekanizmalar da katkıda bulunmaktadır (79). *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri ile karşılaştırıldığında *Enterobacteriaceae* türlerinde MİK değerleri genellikle düşük olduğundan, karbapenemaz üretiminin değerlendirmesi için yeterli değildir. Konvansiyonel antimikrobiyal duyarlılık testlerinde ve otomatize sistemlerde karbapenemaz üretiminin tespitinde problemler yaşanmaktadır (16). Her ne kadar artmış karbapenem MİK'i karbapenemaz üretimine işaret ediyor olsa da suşlar her zaman klinik olarak dirençli olmayabilir (79).

*Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz tanımlanması için uygun fenotipik test mevcuttur (159). Ancak henüz MBL üretiminin araştırılmasında kullanılabilinecek yüksek sensitivite ve spesifitede bir test mevcut değildir (17). MBL üretiminin hızlı tespiti için disk diffüzyonu temel alan bazı fenotipik test yöntemleri ileri sürülmüştür (160). Bu fenotipik testler MBL enzimlerinin etkinliğinin EDTA ve tiol-bazlı bileşikler gibi metal şelatörleri ile inhibe edilmesi prensibine dayalı yöntemlerdir (161). Aynı zamanda MBL genlerinin varlığını doğrulamak amacıyla PZR, DNA hibridizasyon ve benzeri moleküler yöntemlere de ihtiyaç vardır (16).

#### 2.2.6.1. Modifiye Hodge Testi

*Neisseria gonorrhoeae* ve diğer bakterilerde beta laktamaz üretiminin tayini için Hodge tarafından geliştirilmiş olan bu test Lee ve ark. (162) tarafından modifiye edilerek *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. için MBL tayininde kullanılabilir hale getirilmiştir. Ancak bu testin MBL üretiminin saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür ve nonfermantatif gram negatif basillerde karbapenemaz üretiminin saptanmasındaki yararına ilişkin veri oldukça azdır (159).



## 2.2.6.2. İnhibitörlerle Yapılan Mikrobiyolojik Testler

### 2.2.6.2.1. Çift Disk Sinerji Testi

CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, EDTA ve merkaptosülfonik asitler, merkaptoetanol gibi tiol bileşikler MBL aktivitesini bozan ajanlardır. Bu inhibitörlerle MBL aktivitesinin engellenmesi ile MBL üretimi araştırılabilmektedir. Bu amaçla imipenem, seftazidim ya da sefepim diskleri ve MBL inhibitörü olarak EDTA ya da 2-merkaptopropiyonik asitin (MPA) kullanıldığı çift disk sinerji testleri kullanılmaktadır (12,79,163). İmipenem-EDTA çift disk sinerji testinin duyarlılığı *Pseudomonas* spp. için %100 ve *Acinetobacter* spp. için %95.7'dir (79,164). Uygulanması kolay olan bu yöntemde kullanılan disk ve diskler arası mesafe henüz standardize edilememiştir ve değerlendirmesi her zaman kolay olmamaktadır (9).

### 2.2.6.2.2. Kombine Disk Testi

Disk diffüzyon metoduna uygun şekilde çalışılan bu test, imipenemin ya da seftazidimin oluşturduğu inhibisyon zonu ile bunların EDTA ile kombinasyonunun oluşturduğu inhibisyon zonunun kıyaslanması esasına dayanmaktadır (164). İmipeneme duyarlı *P. aeruginosa* izolatlarında MBL araştırılmasında sefepim/klavulanik asit diskinin MPA ile kombine edilerek kullanılabilmesi de bildirilmiştir (165) Kombine disk testinin gerek çalışılması gerekse değerlendirilmesi oldukça kolaydır. Ancak MBL üreten imipenem duyarlı izolatlar için henüz standardize edilmemiştir (9).

### 2.2.6.2.3. E Test

İmipenem ya da seftazidim MİK'inin bu antibiyotiklerin EDTA ya da MPA gibi şelatörler ile kombinasyonlarının MİK'leri ile kıyaslanması esasına dayalı olan bu testte ticari olarak üretilmiş olan E test stipleri kullanılmaktadır. İmipenem dirençli suşlarda MBL üretiminin tespitinde IMP/IMP+EDTA E test (IP/IPI E test) şeritlerinin; CAZ/MPA E test şeritlerinden daha etkili bulunduğu çalışmalar mevcuttur. İmipenem duyarlı suşlarda ise imipenem ya da imipenem-EDTA MİK'i mevcut testteki değerlerden yüksek olduğunda kıyaslanma yapılamayacağından E test yöntemi kullanışlı değildir (165-167). Yapılması ve değerlendirmesi kolay bir testtir ancak imipenem sensitif olup MBL üreten izolatlarda yararlı bir yöntem değildir ve sınırdaki vakalar kaçırılmaktadır (9).

#### 2.2.6.2.4. Mikrodilüsyon Testi

Mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen imipenem MİK'i değerinin imipenemin EDTA ve 1.10-fenantiolin ile kombinasyonunda elde edilen MİK değeri ile kıyaslanması esasına dayalı bir yöntemdir. İmipeneme dirençli *P. aeruginosa* izolatları için önerilen bu yöntemin duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu rapor edilmiştir (160). Değerlendirilmesinin kolay oluşu bir avantajdır fakat konu ile ilgili uzmanlık isteyen ve emek yoğun bir test olması dezavantajlarıdır (9).

#### 2.2.6.3 Karbapenem Hidrolizinin Araştırılması

Bakteriyel hücre ekstratlarının karbapenem hidrolizine yol açıp açmaması ve hidrolizin EDTA'dan etkilenip etkilenmemesi üzerinde temellendirilmiş bir testtir. Moleküler testler dışında tek altın standart yöntem, karbapenem hidrolizinin araştırılmasıdır. Ancak özel ekipman, konuyla ilgili uzmanlık ve yoğun emek gerektirmektedir. Ayrıca yorumlanması basit değildir (9,79).

#### 2.2.6.4. Moleküler Testler

MBL tayininde özgüllüğü en yüksek olan yöntemler moleküler testlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), MBL varlığını araştırmada ve tipini belirlemede uygulaması kolay ve en hızlı yöntemdir. Yüksek özgüllükte DNA primerlerine ihtiyaç olması, varyantları birbirinden ayırt edemiyor olması ve yeni varyantların saptanamaması dezavantajlarıdır (9,115).

Bazı laboratuvarlar çok sayıda klinik izolatta MBL geninin araştırılmasında koloni blot hibridizasyon tekniğini kullanmaktadır. Aynı zamanda Southern blot tekniği ile MBL geninin kromozomda mı plazmidde mi bulunduğunu araştırmak mümkün olmaktadır (9).

Bunun yanı sıra izoelektrik odaklama, poliakrilamid jel elektroforezi, nükleotid sekans analizi de MBL tanısında kullanılan moleküler teknikler arasında yer almaktadır. Klonlama ve sekans analizi moleküler altın standart yöntemlerdir. Emek yoğun bir yöntem olduğu gibi verilerin değerlendirmesi de özel uzmanlık gerektirmektedir (9,11,168).

### 2.2.7. Metallo Beta Laktamaz Üreten *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Sıklıkla MBL üreten suşlar; beta laktamlar, aminoglikozidler ve kinolonlara dirençlidirler. Bunun yanı sıra genellikle polimiksine duyarlıdırlar. Bu tür mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için belirlenmiş uygun bir protokol henüz mevcut değildir. Karbapenem üretiminin tespit edilmesinin en önemli sonucu karbapenem kullanımının kontrendike olmasıdır. Metallo enzimlerinin invitro inhibisyonu mümkün olsa bile bu inhibitörlerin hasta tedavisinde kullanılması mümkün değildir. Aminoglikozidlerin tedavi tercihleri arasında tutulabilmesi; bu ajanlar için MİK'lerin belirlenmesiyle ve bu moleküllerin monoterapi şeklinde kullanılmasıyla sağlanabilmektedir. Korezistans söz konusu olabildiğinden beta laktamazlar dışındaki antibiyotiklerin kullanımı da kısıtlanmaktadır. Tek terapötik seçenek olarak ise çoklu ilaca dirençli gram negatif basil enfeksiyonlarında etkinliği ispatlanmış olan polimiksinler kalmaktadır. İlginçtir ki, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonu tedavisinde rifampisinden de bahsedilebilmektedir (9). Yeni antipsödomonal ajanların geliştirilememiş olması hekimleri kolistin gibi eski ve ciddi yan etkileri olan ajanların kullanımına itmiştir. Ayrıca çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında tikarsilin ve rifampisin veya tikarsilin ve tobramislin gibi kombinasyon tedavileri de söz konusu olmaktadır (12).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Çalışma Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na 2008-2010 yıllarında gönderilmiş 356 hastanın çeşitli klinik örneklerinde imipenem ve/veya meropenem orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* izolatları saptandı. 356 hastanın her birinden ilk izole edilen olmak koşuluyla 334 izolat çalışmaya alındı ve 22 izolat ise tekrar canlandırılmadığından çalışmadan çıkarıldı. Çalışma izolatlarının izole edildiği materyal, kültürün istem tarihi, hastanın yatış tarihi ve yattığı servis Tablo 8'de verildi.

**Tablo 8. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri**

İzolat Kodu	Materyal	İstem Tarihi	Yatış Tarihi	Servis
PA1	İdrar	04.01.2010	18.10.2009	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA2	Yara sürüntü	10.01.2010	26.12.2009	Nöroşirurji YBS
PA3	Trakeal aspirat	11.01.2010	06.01.2010	Anestezi YBS
PA4	Torasentez sıvısı	12.01.2010	13.10.2009	Pediyatri Hematoloji Servisi
PA5	Trakeal aspirat	14.01.2010	26.10.2009	Nöroloji YBS
PA6	Balgam	17.01.2010	15.01.2010	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA7	BAL	18.01.2010	15.01.2010	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA8	Kan	18.01.2010	25.12.2009	Yanık Ünitesi
PA9	Trakeal aspirat	18.01.2010	18.01.2010	Anestezi YBS
PA10	Kan	18.01.2010	31.12.2009	Anestezi YBS
PA11	İdrar	21.01.2010	-	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği
PA12	Kan	26.01.2010	31.12.2009	Ortopedi Servisi
PA13	Trakeal aspirat	02.02.2010	15.01.2010	Nöroloji YBS
PA14	Trakeal aspirat	05.02.2010	16.10.2009	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
PA15	Trakeal aspirat	06.02.2010	05.02.2010	Yenidoğan YBS
PA16	İdrar	12.02.2010	12.02.2010	Kalp Damar Cerrahi Servisi
PA17	Trakeal aspirat	13.02.2010	20.01.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi

Tablo 8'in devamı

PA18	Trakeal aspirat	15.02.2010	22.01.2010	Pediatric Enfeksiyon Servisi
PA19	Trakeal aspirat	19.02.2010	19.02.2010	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA20	İdrar	01.03.2010	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA21	İdrar	03.03.2010	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA22	Balgam	19.03.2010	18.03.2010	Dahiliye YBS
PA23	Trakeal aspirat	23.03.2010	28.08.2009	Yenidoğan YBS
PA24	Püy	23.03.2010	10.03.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA25	Konjunktiva sürüntü	23.03.2010	15.03.2010	Pediatric YBS
PA26	Kan	27.03.2010	08.01.2010	Yenidoğan YBS
PA27	Yanık sürüntü	29.03.2010	23.03.2010	Yanık Ünitesi
PA28	Trakeal aspirat	02.04.2010	20.03.2010	Anestezi YBS
PA29	Trakeal aspirat	07.04.2010	09.03.2010	Yenidoğan YBS
PA30	İdrar	09.04.2010	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA31	Trakeal aspirat	09.04.2010	30.03.2010	Pediatric YBS
PA32	Trakeal aspirat	12.04.2010	04.04.2010	Anestezi YBS
PA33	Trakeal aspirat	12.04.2010	08.03.2010	Pediatric YBS
PA34	İdrar	14.04.2010	14.04.2010	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA35	Trakeal aspirat	16.04.2010	26.03.2010	Pediatric YBS
PA36	Kulak sürüntü	20.04.2010	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA37	Balgam	28.04.2010	08.03.2010	Dahiliye Servisi
PA38	Trakeal aspirat	28.04.2010	25.04.2010	Anestezi YBS
PA39	Kan	29.04.2010	07.04.2010	Pediatric Cerrahi Servisi
PA40	Trakeal aspirat	30.04.2010	10.03.2010	Yenidoğan YBS
PA41	Vajinal sürüntü	30.04.2010	22.04.2010	Pediatric Hematoloji Servisi
PA42	İdrar	02.05.2010	24.03.2010	Yanık Ünitesi
PA43	Yanık sürüntü	03.05.2010	19.04.2010	Yanık Ünitesi
PA44	Trakeal aspirat	12.05.2010	10.05.2010	Anestezi YBS
PA45	Trakeal aspirat	31.05.2010	25.05.2010	Dahiliye Onkoloji Servisi
PA46	Kan	02.06.2010	23.05.2010	Dahiliye YBS
PA47	Apse	05.06.2010	18.05.2010	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA48	Trakeal aspirat	06.06.2010	24.05.2010	Nöroşirurji YBS
PA49	Apse	06.06.2010	28.05.2010	Yanık Ünitesi
PA50	Trakeal aspirat	06.06.2010	18.05.2010	Anestezi YBS
PA51	Yara sürüntü	12.06.2010	02.06.2010	Anestezi YBS
PA52	İdrar	15.06.2010	14.05.2010	Nöroloji YBS
PA53	Trakeal aspirat	16.06.2010	15.06.2010	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA54	Trakeal aspirat	18.06.2010	10.06.2010	Nöroloji Servisi
PA55	Yanık sürüntü	21.06.2010	22.05.2010	Yanık Ünitesi
PA56	Yanık sürüntü	21.06.2010	22.05.2010	Yanık Ünitesi
PA57	İdrar	27.06.2010	26.06.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA58	Trakeal aspirat	28.06.2010	17.06.2010	Nöroloji YBS
PA59	Trakeal aspirat	01.07.2010	04.06.2010	Anestezi YBS
PA60	Trakeal aspirat	03.07.2010	16.06.2010	Yenidoğan YBS
PA61	Trakeal aspirat	08.07.2010	18.06.2010	Nöroloji YBS
PA62	Kulak sürüntü	14.07.2010	09.07.2010	Kulak Burun Boğaz Servisi

Tablo 8'in devamı

PA63	Yara sürüntü	19.07.2010	18.06.2010	Kadın Doğum Servisi
PA64	Yanık sürüntü	19.07.2010	24.06.2010	Yanık Ünitesi
PA65	Yara sürüntü	27.07.2010	22.07.2010	Yanık Ünitesi
PA66	Yanık sürüntü	02.08.2010	22.07.2010	Yanık Ünitesi
PA67	Apse	02.08.2010	16.07.2010	Dahiliye Onkoloji Servisi
PA68	Trakeal aspirat	05.08.2010	05.08.2010	Nöroloji Servisi
PA69	Katater	05.08.2010	02.08.2010	Yenidoğan YBS
PA70	Diren	07.08.2010	19.07.2010	Anestezi YBS
PA71	Trakeal aspirat	08.08.2010	12.06.2010	Yenidoğan YBS
PA72	Yanık sürüntü	09.08.2010	26.07.2010	Yanık Ünitesi
PA73	Trakeal aspirat	11.08.2010	27.07.2010	Yenidoğan YBS
PA74	Trakeal aspirat	11.08.2010	19.06.2010	Yenidoğan YBS
PA75	Trakeal aspirat	11.08.2010	27.07.2010	Yenidoğan YBS
PA76	Trakeal aspirat	14.08.2010	16.07.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA77	İdrar	18.08.2010	26.06.2010	Pediyatri YBS
PA78	Trakeal aspirat	21.08.2010	29.07.2010	Yenidoğan YBS
PA79	Yara sürüntü	23.08.2010	-	Plastik Cerrahi Polikliniği
PA80	Trakeal aspirat	24.08.2010	20.07.2010	Yenidoğan YBS
PA81	Yara sürüntü	25.08.2010	-	Ortopedi Polikliniği
PA82	Diren	05.09.2010	03.09.2010	Dahiliye YBS
PA83	Trakeal aspirat	06.09.2010	25.08.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA84	Trakeal aspirat	10.09.2010	04.09.2010	Kardiyoloji Servisi
PA85	Trakeal aspirat	11.09.2010	04.09.2010	Anestezi YBS
PA86	Trakeal aspirat	12.09.2010	02.09.2010	Yenidoğan YBS
PA87	Kanül	12.09.2010	30.08.2010	Pediyatri YBS
PA88	İdrar	19.09.2010	21.08.2010	Yanık Ünitesi
PA89	Vajinal sürüntü	21.09.2010	02.09.2010	Pediyatri Adölsan Servisi
PA90	Yara sürüntü	27.09.2010	13.09.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA91	Yara sürüntü	27.09.2010	13.09.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA92	Trakea Aspirasyonu	27.09.2010	30.08.2010	Pediyatri YBS
PA93	Trakeal aspirat	27.09.2010	15.07.2010	Nöroloji YBS
PA94	İdrar	29.09.2010	22.09.2010	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA95	Katater	30.09.2010	26.08.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA96	Trakeal aspirat	05.10.2010	22.09.2010	Pediyatri YBS
PA97	Trakeal aspirat	08.10.2010	06.10.2010	Nöroloji YBS
PA98	Trakea Aspirasyonu	10.10.2010	05.10.2010	Nöroloji YBS
PA99	Parasentez sıvısı	13.10.2010	02.10.2010	Dahiliye YBS
PA100	Balgam	13.10.2010	23.08.2010	Nöroloji YBS
PA101	Trakeal aspirat	14.10.2010	05.10.2010	Pediyatri YBS
PA102	Safra	15.10.2010	24.09.2010	Genel Cerrahi Servisi
PA103	Trakeal aspirat	18.10.2010	17.07.2010	Nöroşirurji YBS
PA104	Trakeal aspirat	18.10.2010	29.09.2010	Kardiyoloji Servisi
PA105	Trakeal aspirat	27.10.2010	20.10.2010	Anestezi YBS
PA106	Trakea Aspirasyonu	01.11.2010	31.10.2010	Kardiyovasküler Cerrahi Servisi
PA107	BAL.	04.11.2010	09.10.2010	Göğüs Hastalıkları YBS

Tablo 8'in devamı

PA108	Trakeal aspirat	04.11.2010	30.10.2010	Kardiyoloji Servisi
PA109	Kulak sürüntü	09.11.2010	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA110	Kulak sürüntü	10.11.2010	13.10.2010	Pediyatri Adölsan Servisi
PA111	İdrar	11.11.2010	27.10.2010	Nöroşirurji YBS
PA112	Trakeal aspirat	19.11.2010	15.10.2010	Kardiyovasküler Cerrahi Servisi
PA113	Yara sürüntü	22.11.2010	22.11.2010	Plastik Cerrahi Servisi
PA114	İdrar	22.11.2010	-	Üroloji Polikliniği
PA115	Kan	23.11.2010	02.11.2010	Dahiliye YBS
PA116	Apse	26.11.2010	20.11.2010	Dahiliye Servisi
PA117	Trakeal aspirat	30.11.2010	13.09.2010	Pediyatri YBS
PA118	Yara sürüntü	02.12.2010	08.11.2010	Yenidoğan YBS
PA119	Trakeal aspirat	17.12.2010	28.11.2010	Göğüs Hastalıkları YBS
PA120	İdrar	30.12.2010	29.12.2010	Üroloji Servisi
PA121	Trakeal aspirat	04.01.2009	04.12.2008	Cerrahi YBS
PA122	Kulak sürüntü	05.01.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA123	BAL.	07.01.2009	07.01.2009	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA124	Trakeal aspirat	09.01.2009	19.12.2008	Nöroloji YBS
PA125	Yara sürüntü	18.01.2009	01.01.2009	Ortopedi Servisi
PA126	Trakeal aspirat	20.01.2009	11.10.2008	Nöroloji YBS
PA127	Trakeal aspirat	20.01.2009	28.10.2008	Nöroşirurji YBS
PA128	Trakeal aspirat	20.01.2009	17.12.2008	Nöroşirurji YBS
PA129	Yara sürüntü	21.01.2009	11.01.2009	Dahiliye Servisi
PA130	Trakeal aspirat	21.01.2009	04.11.2008	Yenidoğan YBS
PA131	Kulak sürüntü	26.01.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA132	Balgam	27.01.2009	16.12.2008	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA133	Trakeal aspirat	02.02.2009	21.01.2009	Nöroloji YBS
PA134	İdrar	05.02.2009	26.12.2008	Nöroloji YBS
PA135	Trakeal aspirat	07.02.2009	03.02.2009	Yenidoğan YBS
PA136	Yara sürüntü	09.02.2009	02.02.2009	Plastik Cerrahi Servisi
PA137	Burun sürüntü	09.02.2009	13.01.2009	Kardiyoloji Servisi
PA138	Trakeal aspirat	13.02.2009	05.01.2009	Nöroşirurji YBS
PA139	Trakeal aspirat	27.02.2009	24.02.2009	Nöroloji YBS
PA140	Trakeal aspirat	25.02.2009	22.01.2009	Yenidoğan YBS
PA141	İdrar	03.03.2009	-	Üroloji Polikliniği
PA142	Deri sürüntüsü	05.03.2009	21.02.2009	Dahiliye YBS
PA143	Yara sürüntü	06.03.2009	-	Acil Poliklinik
PA144	Trakeal aspirat	06.03.2009	10.02.2009	Yenidoğan YBS
PA145	İdrar	07.03.2009	06.03.2009	Dahiliye YBS
PA146	İdrar	09.03.2009	15.02.2009	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
PA147	İdrar	13.03.2009	-	Pediyatrik Nefroloji Poliklinik
PA148	Trakeal aspirat	13.03.2009	24.02.2009	Nöroşirurji YBS
PA149	İdrar	18.03.2009	22.02.2009	Nöroşirurji YBS
PA150	Yara sürüntü	19.03.2009	03.03.2009	Genel Cerrahi Servisi
PA151	Yara sürüntü	02.03.2009	11.02.2009	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi
PA152	İdrar	24.03.2009	-	Üroloji Polikliniği

Tablo 8'in devamı

PA153	Katater	28.03.2009	12.02.2009	Cerrahi YBS
PA154	Trakeal aspirat	30.03.2009	27.03.2009	Nöroşirurji YBS
PA155	İdrar	02.04.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA156	Kulak sürüntü	03.04.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA157	İdrar	03.04.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA158	Trakeal aspirat	06.04.2009	25.03.2009	Dahiliye YBS
PA159	Yara sürüntü	10.04.2009	06.04.2009	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA160	Kan	11.04.2009	09.04.2009	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA161	Kulak sürüntü	14.04.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA162	Trakeal aspirat	20.04.2009	08.04.2009	Dahiliye YBS
PA163	Trakeal aspirat	21.04.2009	06.03.2009	Dahiliye YBS
PA164	Trakeal aspirat	25.04.2009	25.04.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA165	İdrar	15.05.2009	15.05.2009	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi
PA166	Kateter	05.10.2009	28.09.2009	Genel Cerrahi Servisi
PA167	İdrar	11.05.2009	24.04.2009	Nöroloji Servisi
PA168	Trakeal aspirat	11.05.2009	20.04.2009	Anestezi YBS
PA169	İdrar	18.05.2009	13.04.2009	Dahiliye YBS
PA170	Yara sürüntü	18.05.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA171	İdrar	23.05.2009	21.05.2009	Dahiliye YBS
PA172	Trakeal aspirat	25.05.2009	29.04.2009	Anestezi YBS
PA173	Kulak sürüntü	25.05.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA174	Yara sürüntü	26.05.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi
PA175	Kan	28.05.2009	17.05.2009	Dahiliye Onkoloji Servisi
PA176	İdrar	29.05.2009	02.05.2009	Nöroşirurji YBS
PA177	Trakeal aspirat	30.05.2009	29.05.2009	Nöroşirurji YBS
PA178	Trakeal aspirat	03.06.2009	27.05.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA179	Kulak sürüntü	04.06.2009	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA180	Trakeal aspirat	04.06.2009	23.05.2009	Anestezi YBS
PA181	Trakeal aspirat	09.06.2009	11.05.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA182	Trakeal aspirat	10.06.2009	29.04.2009	Nöroşirurji YBS
PA183	Balgam	22.06.2009	07.06.2009	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA184	Trakeal aspirat	22.06.2009	10.06.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA185	Katerer	23.06.2009	14.05.2009	Nöroşirurji YBS
PA186	Trakeal aspirat	23.06.2009	26.05.2009	Anestezi YBS
PA187	Balgam	24.06.2009	19.06.2009	Nöroloji Servisi
PA188	Kan	25.06.2009	25.05.2009	Anestezi YBS
PA189	Trakeal aspirat	28.06.2009	24.06.2009	Dahiliye YBS
PA190	Trakeal aspirat	30.06.2009	22.06.2009	Kardiyoloji Servisi
PA191	Trakeal aspirat	03.07.2009	10.04.2009	Yenidoğan YBS
PA192	Trakeal aspirat	03.07.2009	12.06.2009	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA193	Yara sürüntü	11.07.2009	-	Göğüs Cerrahisi Servisi
PA194	Balgam	20.07.2009	-	Acil Poliklinik
PA195	Trakeal aspirat	28.07.2009	12.07.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA196	Katater	29.07.2009	11.07.2009	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA197	Diren kültürü	29.07.2009	18.05.2009	Genel Cerrahi Servisi



Tablo 8'in devamı

PA198	Kan	31.07.2009	17.07.2009	Dahiliye Nefroloji Servisi
PA199	Yara sürüntü	31.07.2009	10.06.2009	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA200	Trakeal aspirat	02.08.2009	30.04.2009	Nöroloji YBS
PA201	Trakeal aspirat	03.08.2009	23.07.2009	Kardiyoloji Servisi
PA202	Vajinal sürüntü	04.08.2009	13.07.2009	Nöroşirurji YBS
PA203	İdrar	16.08.2009	30.07.2009	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA204	Trakeal aspirat	17.08.2009	24.04.2009	Yenidoğan YBS
PA205	Apse	19.08.2009	26.07.2009	Genel Cerrahi Servisi
PA206	Trakeal aspirat	24.08.2009	26.07.2009	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA207	İdrar	26.08.2009	07.08.2009	Pediatric Cerrahi Servisi
PA208	Trakeal aspirat	27.08.2009	27.08.2009	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA209	Trakeal aspirat	08.09.2009	21.08.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA210	Trakeal aspirat	08.09.2009	07.09.2009	Anestezi YBS
PA211	Trakeal aspirat	09.09.2009	22.08.2009	Anestezi YBS
PA212	Trakeal aspirat	09.09.2009	16.08.2009	Anestezi YBS
PA213	Yara sürüntü	17.08.2009	31.07.2009	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA214	Trakeal aspirat	21.09.2009	31.08.2009	Anestezi YBS
PA215	Trakeal aspirat	22.09.2009	10.09.2009	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA216	Trakeal aspirat	25.09.2009	24.09.2009	Anestezi YBS
PA217	Trakeal aspirat	28.09.2009	08.09.2009	Kardiyovasküler Cerrahi Servisi
PA218	Kan	07.10.2009	07.10.2009	Dahiliye Onkoloji Servisi
PA219	Trakeal aspirat	09.10.2009	06.09.2009	Nöroloji YBS
PA220	Kan	20.10.2009	19.09.2009	Nöroloji YBS
PA221	Balgam	28.10.2009	05.10.2009	Pediatric Süt Çocuğu Servisi
PA222	Püy	03.11.2009	-	Ortopedi Polikliniği
PA223	İdrar	05.11.2009	07.10.2009	Nöroşirurji YBS
PA224	Apse	09.11.2009	-	Acil Poliklinik
PA225	Yanık sürüntü	11.11.2009	11.11.2009	Yanık Ünitesi
PA226	Yara sürüntü	13.11.2009	21.10.2009	Dahiliye Hematoloji Servisi
PA227	İdrar	23.11.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA228	İdrar	01.12.2009	13.11.2009	Göğüs Hastalıkları YBS
PA229	İdrar	07.12.2009	-	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği
PA230	Trakeal aspirat	10.12.2009	18.11.2009	Anestezi YBS
PA231	İdrar	13.12.2009	18.10.2009	Anestezi YBS
PA232	Trakeal aspirat	20.12.2009	07.12.2009	Yenidoğan YBS
PA233	Apse	30.12.2009	14.12.2009	Anestezi YBS
PA234	Trakeal aspirat	30.12.2009	24.12.2009	Anestezi YBS
PA235	Trakeal aspirat	31.12.2009	04.12.2009	Yenidoğan YBS
PA236	Ameliyat materyali	05.01.2008	05.12.2007	Ortopedi Servisi
PA237	Trakeal aspirat	13.01.2008	09.11.2007	Nöroloji YBS
PA238	İdrar	29.01.2008	21.12.2007	Dahiliye Servisi
PA239	Trakeal aspirat	31.01.2008	07.01.2008	Yenidoğan YBS
PA240	İdrar	03.02.2008	-	Acil Poliklinik
PA241	Yara sürüntü	14.02.2008	22.01.2008	Plastik Cerrahi Servisi
PA242	Yara sürüntü	29.02.2008	-	Ortopedi Polikliniği

Tablo 8'in devamı

PA243	Trakeal aspirat	03.03.2008	14.01.2008	Nöroşirurji YBS
PA244	Trakeal aspirat	19.03.2008	29.01.2008	Pediyatri Adölsan Servisi
PA245	Kan	20.03.2008	04.03.2008	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA246	İdrar	23.03.2008	14.02.2008	Yenidoğan YBS
PA247	İdrar	27.03.2008	19.03.2008	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi
PA248	Trakeal aspirat	27.03.2008	24.03.2008	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA249	İdrar	30.03.2008	-	Acil Poliklinik
PA250	Yara sürüntü	31.03.2008	03.03.2008	Ortopedi Servisi
PA251	Trakeal aspirat	01.04.2008	29.02.2008	Dahiliye YBS
PA252	Trakeal aspirat	04.04.2008	06.02.2008	Yenidoğan YBS
PA253	İdrar	11.04.2008	07.04.2008	Dahiliye YBS
PA254	Trakeal aspirat	16.04.2008	20.02.2008	Nöroşirurji YBS
PA255	İdrar	24.04.2008	-	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
PA256	Trakeal aspirat	25.04.2008	02.04.2008	Nöroşirurji YBS
PA257	İdrar	25.04.2008	25.04.2008	Üroloji Servisi
PA258	Safra	28.04.2008	-	Gastroenteroloji Polikliniği
PA259	Diren	01.05.2008	04.03.2008	Cerrahi YBS
PA260	Trakeal aspirat	09.05.2008	21.04.2008	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA261	Trakeal aspirat	11.05.2008	22.04.2008	Cerrahi YBS
PA262	Yara sürüntü	13.05.2008	09.05.2008	Ortopedi Servisi
PA263	İdrar	13.05.2008	13.05.2008	Üroloji Servisi
PA264	İdrar	13.05.2008	08.05.2008	Nöroşirurji YBS
PA265	Trakeal aspirat	13.05.2008	01.05.2008	Nöroloji YBS
PA266	Kan	14.05.2008	02.05.2008	Cerrahi YBS
PA267	Yara sürüntü	16.05.2008	25.04.2008	Plastik Cerrahi Servisi
PA268	Trakeal aspirat	22.05.2008	02.04.2008	Cerrahi YBS
PA269	Trakeal aspirat	22.05.2008	29.04.2008	Yenidoğan YBS
PA270	Trakeal aspirat	23.05.2008	03.05.2008	Yenidoğan YBS
PA271	Trakeal aspirat	23.05.2008	14.05.2008	Yenidoğan YBS
PA272	Trakeal aspirat	23.05.2008	25.01.2008	Cerrahi YBS
PA273	İdrar	27.05.2008	-	Üroloji Polikliniği
PA274	Trakeal aspirat	01.06.2008	08.05.2008	Cerrahi YBS
PA275	Trakeal aspirat	04.06.2008	12.05.2008	Pediyatri Adölsan Servisi
PA276	Balgam	24.06.2008	20.05.2008	Nöroloji YBS
PA277	Kulak sürüntü	24.06.2008	-	Kulak Burun Boğaz Polikliniği
PA278	Kan	29.06.2008	31.05.2008	Cerrahi YBS
PA279	Trakeal aspirat	27.06.2008	04.06.2008	Cerrahi YBS
PA280	Trakeal aspirat	29.06.2008	08.05.2008	Cerrahi YBS
PA281	Trakeal aspirat	30.06.2008	25.06.2008	Yenidoğan YBS
PA282	İdrar	02.07.2008	23.06.2008	Kardiyoloji Servisi
PA283	Trakeal aspirat	11.07.2008	01.07.2008	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
PA284	Ağız içi lezyon sürüntü	12.07.2008	06.06.2008	Dahiliye Hematoloji Servisi
PA285	Trakeal aspirat	14.07.2008	11.06.2008	Nöroşirurji YBS
PA286	Yara sürüntü	14.07.2008	20.06.2008	Ortopedi Servisi
PA287	Trakeal aspirat	15.07.2008	07.07.2008	Cerrahi YBS

Tablo 8'in devamı

PA288	Yara sürüntü	25.07.2008	20.07.2008	Ortopedi Servisi
PA289	Trakeal aspirat	27.07.2008	20.06.2008	Cerrahi YBS
PA290	Yara sürüntü	02.08.2008	28.07.2008	Ortopedi Servisi
PA291	Kan	04.08.2008	26.06.2008	Nöroşirurji YBS
PA292	Trakeal aspirat	10.08.2008	01.07.2008	Nöroşirurji YBS
PA293	İdrar	27.08.2008	-	Acil Poliklinik
PA294	Yara sürüntü	28.08.2008	-	Ortopedi Polikliniği
PA295	Yara sürüntü	04.09.2008	-	Acil Poliklinik
PA296	İdrar	05.09.2008	-	Yenidoğan YBS
PA297	Trakeal aspirat	05.09.2008	18.07.2008	Yenidoğan YBS
PA298	Kan	06.09.2008	20.08.2008	Cerrahi YBS
PA299	İdrar	13.09.2008	20.08.2008	Dahiliye YBS
PA300	Trakeal aspirat	18.09.2008	08.09.2008	Cerrahi YBS
PA301	İdrar	19.09.2008	-	Beyin Cerrahisi Polikliniği
PA302	İdrar	19.09.2008	05.09.2008	Göğüs Hastalıkları Servisi
PA303	Trakeal aspirat	22.09.2008	23.08.2008	Cerrahi YBS
PA304	Trakeal aspirat	23.09.2008	20.09.2008	Kardiyoloji Servisi
PA307	Trakeal aspirat	06.10.2008	10.09.2008	Nöroşirurji YBS
PA308	İdrar	09.10.2008	10.07.2008	Yenidoğan YBS
PA309	Trakeal aspirat	16.10.2008	06.10.2008	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA310	Trakeal aspirat	21.10.2008	10.10.2008	Nöroşirurji YBS
PA311	Konjunktiva sürüntü	22.10.2008	-	Yenidoğan Polikliniği
PA312	Trakeal aspirat	25.10.2008	20.10.2008	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA313	Trakeal aspirat	28.10.2008	01.08.2008	Nöroşirurji Yoğun Bakım
PA314	Trakeal aspirat	31.10.2008	26.08.2008	Pediyatri Adölesan Servisi
PA315	İdrar	04.11.2008	25.09.2008	Genel Cerrahi Servisi
PA316	İdrar	06.11.2008	-	Üroloji Polikliniği
PA317	Trakeal aspirat	08.11.2008	30.10.2008	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA318	İdrar	09.11.2008	-	Acil Poliklinik
PA319	Trakeal aspirat	10.11.2008	04.10.2008	Cerrahi YBS
PA320	Kan	12.11.2008	12.11.2008	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
PA321	Yara sürüntü	18.11.2008	05.11.2008	Ortopedi Servisi
PA322	Trakeal aspirat	18.11.2008	17.11.2008	Cerrahi YBS
PA323	Trakeal aspirat	12.11.2008	17.10.2008	Dahiliye YBS
PA324	Trakeal aspirat	25.11.2008	10.11.2008	Yenidoğan YBS
PA325	Yara sürüntü	27.11.2008	25.10.2008	Dahiliye YBS
PA326	Trakeal aspirat	02.12.2008	16.11.2008	Cerrahi YBS
PA327	Trakeal aspirat	08.12.2008	25.11.2008	Nöroloji YBS
PA328	Trakeal aspirat	10.12.2008	28.11.2008	Cerrahi YBS
PA329	İdrar	10.12.2008	10.12.2008	Acil Servis
PA330	Kan	22.12.2008	01.12.2008	Cerrahi YBS
PA331	Trakeal aspirat	23.12.2008	28.11.2008	Nöroşirurji YBS
PA332	Yara sürüntü	24.12.2008	25.11.2008	Kulak Burun Boğaz Servisi
PA333	İdrar	25.12.2008	03.12.2008	Nöroloji YBS
PA334	Trakeal aspirat	29.12.2008	22.12.2008	Dahiliye YBS

BAL: Bronkoalveolar lavaj sıvısı, YBS: Yoğun Bakım Servisi

### 3.1.2. Araç ve gereçler

Kullanılan sarf malzemeleri şunlardır:

- 0.2 mL'lik ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri (Grainer Bio-One, Almanya),
- 10 µL'lik, 100 µL'lik ve 1000 µL'lik otomatik pipet uçları (Grainer Bio-One, Almanya),
- 10 mL ve 50 mL hacimli *Falcon* tüpleri (Grainer Bio-One, Almanya).

Kullanılan Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı'na ait cihazlar ise şunlardır:

- 37°C'lik etüv (Mettler, Almanya),
- Biyogüvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, Teknomar, Ankara),
- -20°C soğutucu (BEKO, Türkiye),
- -80°C soğutucu (Thermo Scientific, ABD),
- 4°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye),
- Pastör fırını (Heraeus, Portekiz),
- Dikey model yerçekimli otoklav (Kermanlar, Türkiye),
- Otomatize kültür sistemi (BACTEC™ 9240 Blood Culture System) (Becton Dickinson Company, ABD)
- Otomatize mikrobiyolojik bakteri tanımlama sistemi (Phoenix™ 100) cihazı (Becton Dickinson Company, ABD),
- CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD),
- Otomatik pipetler (Lab-mate, İngiltere),
- Çalkalayıcı su banyosu (Mettler, Almanya),
- pH metre (Hanna, Romanya),
- Manyetik karıştırıcı (Stuart, İngiltere),
- Vorteks (Heidolph, Almanya),
- Santrifüj (Thermo Scientific, ABD),
- Buz makinesi (Scotsman, İtalya),
- Hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya),
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye),
- Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere),
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific Owl, ABD), ,

- Jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad, ABD),
- Chef-DR III Pulsed Field Jel elektroforez sistemi (Bio-Rad, ABD),
- VersaDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD),
- UV illüminatör (Wilber Lourmat, Fransa),
- Deiyonize su cihazı (Barnstead, ABD),
- Distile su cihazı (GFL, Ankara).

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

### 3.1.3. Kimyasallar

Bakteri identifikasyon (ID) ve antimikrobiyal duyarlılık test (ADT) indikatörleri (Becton Dickinson Company, ABD), 10 µg meropenem içeren disk (Bioanalyse, Türkiye), 10 µg imipenem içeren disk (Bioanalyse, Türkiye), Tris HCl (Sigma, Almanya), Tris Baz (Sigma, Almanya), EDTA (Sigma, Almanya), Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma, Almanya), Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya), Sodyum klorit (NaCl) (Merck, Almanya), N-lauroilsarkozin (Sigma, Almanya), Gliserol (Merck, Almanya), Kalsiyum Klorür (CaCl<sub>2</sub>) (Sigma, Almanya), Etidyum bromür (Merck, Almanya), Bromfenol mavisi (BioRad, ABD), Ksilen siyanol (Sigma, Almanya), PZR için Agaroz (HIMEDIA, Hindistan), düşük erime ısılı agaroz (HIMEDIA, Hindistan), PFGE için Plus Agaroz (Prona, İngiltere) amplifikasyon seti (Promega, Amerika), dNTP seti (Roche, Almanya ve Fermentas, ABD), primerler (IDT, Amerika ve Biomers, Almanya), 100 bp DNA marker (Labs, New England), Proteinaz K (AppliChem, Almanya), Lambda ladder PFGE marker (Promega, Amerika), Restriksiyon endonükleaz enzimi (*SpeI*) (Promega, Amerika) kullanıldı.

### 3.1.4. Besiyerleri

Kullanılan besi yerleri şunlardır:

- %5 koyun kanlı agar (BD Colombia %5 SD) (Becton Dickinson Company, ABD),
- Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere),
- Çikolatamsı agar (BD-CHOCO) (Becton Dickinson company, ABD),

- Triptik soy broth (Becton Dickinson company, ABD),
- Mueller Hinton agaroz (HIMEDIA, Hindistan),
- Mueller Hinton broth (HIMEDIA, Hindistan),
- Kan kültürü vasatları (BD Bactec Plus Aerobic/F ve BD Bactec Peds Plus/F) (Becton Dickinson company, ABD),
- Bakteri identifikasyon (ID) ve Antimikrobial duyarlılık test (ADT) buyyon (Becton Dickinson company, ABD).

İzolatların saklanması için %15 gliserol içeren triptik soy broth besiyeri kullanıldı. 30 g triptik soy broth, 150 mL gliserol ve 850 mL distile suda eritildi. 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 mL'lik mikrosantifüj tüplerine 1 mL hacimlerde dağıtıldı.

Kombine disk testi ve Modifiye Hodge testi uygulamaları için Mueller Hinton agar (MHA) kullanıldı. 38 g Mueller Hinton agaroz 1000 mL distile suda eritildi ve 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülerek donduruldu.

Polimeraz zincir reaksiyonu için bakteriyel DNA izolasyonu öncesinde Mueller Hinton Broth (MHB) kullanıldı. 22 g Mueller Hinton Broth 1000 mL distile suda çözüldü ve otoklavlanarak steril edildikten sonra 3 mL hacimlerde kapaklı cam tüplere dağıtıldı.

### **3.1.5. Çözeltiler**

#### **3.1.5.1. Tris HCl (1 M, pH: 8.0)**

Tris HCl'den (MW: 157) 15.7 g tartılarak üzerine yaklaşık 80 mL distile su konulduktan sonra HCl ilave edilerek pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim mezür aracılığı ile 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

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

EDTA'dan (MW: 292.2) 29.2 g tartılarak hacmi distile su ile 200 mL'ye tamamlandı ve NaOH pelleti ilave edilerek pH:8.0 olarak ayarlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

### **3.1.5.3. EDTA (0.5 pH: 9.5)**

EDTA'dan (MW: 292.2) 29.2 g tartılarak distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Solüsyona NaOH peleti ilave edilerek pH:9.0 olarak ayarlandı. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavlanarak steril edildi.

### **3.1.5.4. TE Tamponu**

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

### **3.1.5.5. dNTP Karışımı**

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

### **3.1.5.6. Primer Karışımı**

Son konsantrasyonu 100 pmol/µL olacak şekilde liyofilize haldeki primerler steril deiyonize su kullanılarak stok çözeltiler elde edildi. 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine primerlerin stok çözeltilerinin her birinden 20 µL koyuldu. Üzerine 360 µL steril deiyonize su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/µL olan primer karışımı hazırlandı. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

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

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

### **3.1.5.8. Yükleme tamponu**

Gliserol 30 mL bir beher içine konulduktan sonra 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol üzerine eklendi. Beher içinde karıştırıldı ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 1 mL'lik hacimlere bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.1.5.9. Etidyum Bromür**

Son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde 100 mg Etidyum Bromür 10 mL distile su ile çözüldü. Koyu renkli cam şişe içinde oda ısısında muhafaza edildi.

### **3.1.5.10. NaCl (5M)**

NaCl'den (MW: 58.44) 29.22 g tartılarak üzerine distile su ilave edildi ve çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

### **3.1.5.11. N-laurilsarkozin (%10)**

N-lauroilsarkozin'den 10 mg tartılarak 100 mL distile suda çözüldü. Filtre edilerek steril edildi.

### **3.1.5.12. Proteinaz K Hazırlama Tamponu**

Kalsiyum klorürden 0.29 g tartılarak üzerine 50 mL gliserol ve 1 mL 1M Tris HCl (pH:8) koyuldu. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### **3.1.5.13. Proteinaz K (10 mg/mL)**

Proteinaz K'dan 100 mg tartıldı ve 10 mL hazırlama tamponu içine koyuldu. Kristaller çözünene kadar alt üst edilerek karıştırıldı. Küçük hacimlere bölünerek kullanıncaya kadar -20°C'de saklandı.



#### **3.1.5.14. SE Tamponu**

Son konsantrasyonları NaCl için 75 mmol/L ve EDTA (pH: 8) için 25 mmol/L olacak şekilde SE tamponu hazırlandı. 5 M NaCl'den 1.5 mL, 0.5 M EDTA'dan (pH:8.0) 15 mL koyuldu ve distile su ilave edilerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

#### **3.1.5.15. Hücre Lizis Tamponu**

Son konsantrasyonları %1 wt/vol N-lauroilsarkozin, 0.5 M EDTA (pH: 9.5) ve 500 µg/mL Proteinaz K olacak şekilde hücre lizis tamponu hazırlandı.

#### **3.1.5.16. Restriksiyon Tamponu**

Bir örnek için; 20 µL *SpeI* tamponu (10x) ve 180 µL deiyonize su mikrosantrifüj tüpüne koyuldu ve vortekslenerek karıştırıldı.

#### **3.1.5.17. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Karışımı**

Bir örnek için; 20 µL *SpeI* tamponu (10x), 2 µL Bovin Serum Albumin (BSA) (100x), 2 µL *SpeI* enzimi ve 176 µL deiyonize su mikrosantrifüj tüpüne kondu ve vorteksleyerek karıştırıldı.

### **3.1.6. Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesi**

#### **3.1.6.1. Hasta Grupları**

Çalışmamıza dahil edilen 334 hastadan 158'inin dosya bilgileri ve hastane kayıtlarına ulaşıldı ve klinik özellikleri değerlendirmeye alındı. Poliklinikte takip edilmiş olan hastalar ise dosya bilgileri ve hastane kayıtları eksik olduğundan değerlendirmeye alınmadı. Pediatrik yaş ve erişkin yaş yatan hasta olmak üzere iki çalışma grubu belirlendi ve klinik özellikler her iki grup için ayrı ayrı değerlendirilmeye alındı. Klinik örneklerinden saptanmış *P. aeruginosa* izolarında MBL geni tespit edilen hastalar vaka ve metallo beta laktamaz geni tespit edilemeyenler ise kontrol grubu olarak belirlendi.

Böylece 5'i vaka ve 18' kontrol olan toplam 23 pediatrik yaş hasta ve 11'i vaka ve 124'ü kontrol olan toplam 135 erişkin hastanın klinik bilgileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

### 3.1.6.2. Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler

MBL varlığı ile ilişkili olabilecek klinik özellikleri ve MBL varlığının hastanede yatış süresi ve mortalite ile ilişkisini değerlendirmek amacıyla Tablo 9'da verilmiş olan form kullanıldı (5,169).

**Tablo 9. Hastaların klinik özelliklerini değerlendirme formu, (5,169).**

Değerlendirme Formu	
İzolant no	
Hasta adı soyadı	
Hasta dosya no	
Yaş	
Cinsiyet	
Yattığı servis	Pediyatri/dahili servisi Hematoloji/onkoloji servisi Yanık Ünitesi Yoğun bakım servisi
Enfeksiyon özelliği	Tek organizma Polimikrobiyal Alt solunum yolu Üriner sistem
Enfeksiyon bölgesi	Cilt ve yumuşak doku Santral sinir sistemi Katater İntraabdominal Primer kan akımı Diğer <sup>a</sup> Birden fazla bölge
Enfeksiyonun neticesi	Sağ Mortal
Hastanede yatış süresi	Enfeksiyon tespitinden önce Enfeksiyon tespitinden sonra
Beraberinde başka bir enfeksiyon varlığı	
Enfeksiyonun ilk 48 sa' inde YBS' inde yatış	
Enfeksiyonla ilişkili sepsis ya da septik şok	
Eşlik eden hastalık	Nötropeni (Absolüt Nötrofil>500 /mm <sup>3</sup> ) Karaciğer yetmezliği Böbrek yetmezliği Metabolik hastalık Diabet Kardiak hastalık Pulmoner hastalık Nörolojik hastalık İmmün yetmezlik (AIDS, Konj.) Solid kanser Hematolojik malignite Geçirilmiş organ transplantasyonu

Tablo 9'un devamı

Enfeksiyon esnasında invaziv girişim	Santral venöz katater Üriner kataterizasyon Mekanik ventilasyon Total parenteral nutrisyon Hemodializ Diğer <sup>b</sup>
Son 30 günde	Hospitalizasyon Cerrahi işlem Travma
Son 30 günde immünoşüpresif ilaç kullanımı	Steroid kullanımı Diğer immünoşüpresif ajanlar Penisilinler
Enfeksiyondan önceki 30 gün içinde	1 veya 2 kuşak sefalosporinler 3 kuşak sefalosporinler Karbapenemler Monobaktamlar

<sup>a</sup>: Kulak sürüntü, konjonktiva, <sup>b</sup>: Ventrikulo-Peritoneal Şant, göğüs tüpü, nefrostomi, kolostomi, periton dializ katateri.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirmesi

##### 3.2.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2008-2010 yıllarında laboratuvarımıza gelen idrar örnekleri %5 koyun kanlı agar ve EMB agara inoküle edilirken diğer örnekler ise %5 koyun kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agara inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi. Bu tarihlerde kan kültür vasatına inoküle edilmiş olarak gönderilmiş olan kan örnekleri ise otomatize kültür sisteminde (BACTEC™ 9240 Blood Culture System) inkübe edildi. Üreme sinyali izlendiğinde kan kültür vasatından alınan bir miktar örnek %5 koyun kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agara inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi (170-173).

İnkübasyon sonrasında *Pseudomonas* olduğundan şüphelenilen özel kokusu ve mavi yeşil pigmenti olan laktoz negatif, oksidaz pozitif, nonfermentatif, gram negatif basillere ait kolonilerin identifikasyonu yapıldı ve antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı (24,174). CrystalSpec™ nefelometre kullanılarak ID buyyonu içerisinde yoğunluğu 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı. Böylece konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/mL olan bakteri süspansiyonundan, antimikrobiyal duyarlılık test buyyon tüpüne 25 µL ilave edildi. ADT buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. Bu paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir analiz yapan Phoenix™

cihazına yerleştirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix™ sistemi ile test edildi (175,176). Duyarlılık testlerinin sonuçları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (*Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (159).

*Pseudomonas aeruginosa* olarak tiplendirilen ve imipenem veya meropenemden herhangi birine orta duyarlı ya da dirençli tespit edilen izolatlar, çalışma yapıncaya kadar %15 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (177,178).

### **3.2.1.2. Metallo Beta Laktamazların Fenotipik Olarak Tanımlanması**

#### **3.2.1.2.1. Modifiye Hodge Testi**

Çalışmada indikatör olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 ve negatif kontrol olarak ise *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 kullanıldı.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış çalışma izolatları, kontrol izolatları ve indikatör izolat %5 kanlı agara pasajlanarak taze kültürleri hazırlandı. Önceden hazırlanmış steril serum fizyolojik içinde *E. coli* ATCC 25922 kolonilerinden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon steril eküvyonlu çubuk yardımıyla MHA besiyerine yaygın ekim yöntemi ile inoküle edildi. Besiyerinin yüzeyinin kurumasının ardından  $10\ \mu\text{g}$  meropenem içeren disk besiyerinin merkezine yerleştirildi. Test edilecek bakterinin, pozitif kontrol ve negatif kontrolün taze kültürlerinden öze yardımıyla 3-5 koloni alındı. Meropenem diskinin kenarından dışa doğru en az 20-25 mm uzunluğunda çizgi şeklinde ekim yapıldı. Her plakta bir pozitif kontrol bir negatif kontrol ve iki adet test izolatu olacak şekilde ekimler yapıldı.  $35^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat inkübasyonun ardından plaklar meropenem diski etrafındaki inhibisyon zonu ile izolatların çizgi ekiminin kesiştiği bölgede üreme artışı (inhibisyon zonunda çökme) varlığı açısından değerlendirildi. Üreme artışı gözlenen izolatların test sonucu pozitif kabul edildi (162,159,179).

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

Çalışma izolatlarının ve kontrol izolatlarının %5 kanlı agara pasajlanarak taze kültürleri elde edildi. Daha önceden hazırlanmış içinde serum fizyolojik bulunan cam tüpler içerisinde yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde çalışma ve

kontrol izolatlarının süspansiyonları hazırlandı. MHA besiyerine steril eküvyonlu çubuk kullanılarak bakteri süspansiyonlarının yaygın ekimi yapıldı. Besiyerinin yüzeyinin kurumasının ardından her test izolatı için 10 µg imipenem içeren iki adet hazır disk kullanıldı. Disklerin aralarında en az 22 mm olmak koşuluyla agar yüzeyine yerleştirildi. Disklerden bir tanesinin üzerine 930 µg EDTA (0.5 M, pH 8) eklendi. Plaklar 35±2°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her iki disk etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü. İmipenem+EDTA içeren diskin etrafında oluşmuş inhibisyon zon çapı; sadece imipenem içeren diskin etrafında oluşan inhibisyon zon çapından 7 mm veya daha fazla ise test pozitif olarak değerlendirildi (161). Testte pozitif kontrol olarak ise Özgümüş ve ark.'nın (15) çalışmasında MBL saptanmış olan *P. aeruginosa* izolatlarından IMP pozitif olan 587585 ve VIM pozitif olan 670448 numaralı izolatlar ve negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

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

#### **3.2.1.3.1. DNA İzolasyonu**

Çalışma izolatlarının %5 kanlı agara pasajlanmasıyla elde edilen taze kültürlerinden; 3 mL'lik Mueller Hinton buyyona tek koloni ekimi yöntemiyle pasajları yapıldı. 37°C'de, 200 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bir gece inkübe edildi. Test izolatlarının ürettiği gözlenen bu sıvı besiyerinden 1.5 mL alınarak mikrosantrifüj tüpüne kondu ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant nazikçe dökülerek pelletin üzerine 1 mL TE tamponu eklendi ve vortekslendi. Bu karışım 5000 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant nazikçe döküldükten sonra pelletin üzerine 1 mL deiyonize su koyuldu ve vortekslendi. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant atılarak pelletin üzerine 500 µL deiyonize su eklendi ve vortekslendi. Elde edilen bakteri süspansiyonu 95°C'de 10 dakika kaynatıldıktan sonra 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. İçinde bakteriyel DNA'nın olduğu süpernatantın 400 µL'si yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve PZR işlemi yapılincaya kadar -20°C'de saklandı.

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

Tablo 10’da görüldüğü gibi *bla*<sub>IMP</sub> ve *bla*<sub>VIM</sub> genlerinin varlığını araştırmak için ikiye farklı primer çifti kullanıldı (180-182). *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub> ve *bla*<sub>SPM</sub> genlerinin varlığını araştırmak için ise birer primer çifti kullanıldı (180).

**Tablo 10. PZR’de kullanılan primerlerin sekansları, ürün büyüklükleri, (180-182).**

Primer	Sekans (5’-3’)	Ürün (bp*)	Referans
<i>bla</i> <sub>IMP</sub> (A)	F-1 GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC	188	180
	R-1 CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub> (B)	F-2 ATG AGC AAG TTA TCT TAG TAT TC	765	182
	R-2 GCT GCA ACG GAC TTG TTA G		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub> (A)	F-3 GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	180
	R-3 AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub> (B)	F-4 AGT GGT GAG TAT CCGACA G	261	182
	R-4 ATG AAA GTG CGT GGA GAC		
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	F-5 TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72	180
	R-5 CGGAACGACCATTTGAATGG		
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	F-6 GTACAAGGGATTCGGCATCG	569	180
	R-6 TGGCCTGTTCCCATGTGAG		
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	F-7 CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798	180
	R-7 CCTTTTCCGCGACCTTGATC		

\*bp: Baz çifti

### 3.2.1.3.3. Reaksiyon İçeriğinin Hazırlanması

Reaksiyon bileşenleri Tablo 11’de gösterildiği oranlarda kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve PZR işlemi için kullanıldı. Kullanılacak kimyasallar -20°C’den çıkarıldıktan sonra çözünmesi beklendi ve 5-10 saniye vortekslendi. Tablo 11’de belirtilen sırayla mikrosantrifüj tüpüne pipetlendi ve bu işlemler buz üzerinde yapıldı. Taq polimeraz ise kullanılmadan hemen önce -20°C’den çıkarıldı ve pipetlendi. Steril deiyonize su pipetlendikten sonra elde edilen 45 µL hacmindeki reaksiyon karışımı vortekslendi. Daha sonra test edilecek bakteriler, pozitif kontrol ve negatif kontrollerin önceden izole edilerek -20°C’de saklanmış olan DNA’larından 5 µL’lik hacimlerde her biri için hazırlanmış olan reaksiyon karışımının üzerine pipetlendi. Elde edilen reaksiyon karışımı termal döngü cihazına PZR işlemini gerçekleştirmek üzere konuldu. Pozitif kontrol olarak Özgümüş ve ark.’nın (15) çalışmasında MBL tespit edilen *bla*<sub>IMP</sub> geni için 587585 ve *bla*<sub>VIM</sub> geni için

670448 numaralı *P. aeruginosa* izolatları; negatif kontrol olarak ise *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve deiyonize su kullanıldı.

**Tablo 11. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları**

Reaksiyon bileşeni	Bir örnek için
1. Tampon (5x)	10 µL
2. dNTP karışımı (2.5 mM)	1 µL
3. MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µL
4. Primer karışımı (5 pmol)	3 µL
5. Taq polimeraz (5 U/µL)	0.3 µL
6. ddw	25.7 µL
7. DNA	5 µL
<b>Reaksiyonun toplam hacmi</b>	<b>50 µL</b>

#### 3.2.1.3.4. Genlerin Amplifikasyonu

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan reaksiyon bileşenleri otomatik termal döngü cihazına yerleştirildi. *bla<sub>IMP</sub>* (A), *bla<sub>VIM</sub>* (A), *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>* genleri için 94°C’de 5 dakika denatürasyon sonrası; her döngü için 94°C’de 20 saniye denatürasyon, 53°C’de 45 saniye primer birleşmesi, 72°C’de 30 saniye polimerizasyon aşamalarını içeren 35 döngü uygulandı ve 72°C’de 6 dakika polimerizasyon süresi eklendi (179).

Polimeraz zincir reaksiyonu *bla<sub>IMP</sub>* (B) ve *bla<sub>VIM</sub>* (B) genleri için ise 94°C’de 5 dakika denatürasyon sonrası; her döngü için 94°C’de 25 saniye denatürasyon, 57°C’de 40 saniye primer birleşmesi, 72°C’de 50 saniye polimerizasyon olmak üzere 35 döngü uygulandı ve 72°C’de 6 dakika polimerizasyon süresi eklendi (182).

#### 3.2.1.3.5. Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme

Polimeraz zincir reaksiyonunun ürünlerinin değerlendirmesi agaroz jel elektrofrez ile yapıldı. 5 µg/mL etidyum bromür içeren %2 yoğunlukta agaroz jel hazırlandı. Her bir tepkime tüpünden 10 µL alındı ve 3 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ve son kuyucuklara 10 µL 100 bp adımlı DNA marker yüklendi. Örnekler önce 10 dakika boyunca 80 voltta yürütüldü, sonra 30 dakika boyunca 100 voltta yürütüldü. Elektrofrez işlemi sonrasında jel UV transilluminatörde gözlendi ve jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekildi.

PZR ürünlerinin oluşturduğu bantlar 100 bp adımlı DNA markerın oluşturduğu bantlar ile kıyaslanarak *bla<sub>IMP</sub>* (A), *bla<sub>VIM</sub>* (A), *bla<sub>IMP</sub>* (B) ve *bla<sub>VIM</sub>* (B), *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*,

*bla<sub>SPM</sub>* genlerinin her biri için sırasıyla yaklaşık 188 bp, 382 bp, 765 bp, 261 bp, 72 bp, 569 bp ve 798 bp büyüklüğünde bant varlığı yönünden değerlendirildi (180-182).

### **3.2.1.4. Pulsed Field Gel Elektorforezi**

#### **3.2.1.4.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması**

Tür düzeyinde tanımlanan ve -80°C’de saklanan izolatlar %5 koyun kanlı agar besiyerine ekildi ve 35°C’ de 20-24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Saf bir kültür elde etmek için tekrar triptikaz soy agar besiyerine tek koloni pasajı yapıldı ve uygun koşullarda inkübe edildi (183-185).

Üreyen koloniler öze kullanılarak kapaklı cam tüplerdeki 3 mL SE tamponu ile süspansiyon edildi. Bakteri yoğunluğu CrystalSpec™ nefelometre kullanılarak yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre süspansiyonu 2500 rpm’de 4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pelletin üzerine tekrar 3 mL soğuk SE tamponu eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, tekrar yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı (183-186).

#### **3.2.1.4.2. Bakterinin Agaroza Gömülmesi**

50 mL TE tamponu içinde 1 g düşük erime ısılı agarozun çözülmesiyle hazırlanan %2 (wt/vol) yoğunlukta düşük erime ısılı agaroz, 45-50°C’lik su banyosunda soğumaya bırakıldı (183-185).

Her bir izolat için 1.5 mL’lik santrifüj tüpüne önce 250 mL agaroz sonra 250 mL bakteri süspansiyonu eklendi. Bir kaç kez pipetleme yapılarak bakteri süspansiyonun agaroz ile homojen olarak karışması sağlandı. Elde edilen bakteri-agaroz karışımı önceden 4°C’de soğutulmuş olan agaroz kalıbının kuyucuklarına kondu. Kalıplar önce oda ısısında 10-15 dakika, sonra 4°C’de 5 dakika bekletilerek agarozun katılaşması sağlandı (183-186).

#### **3.2.1.4.3. Bakteriyel DNA’nın İzolasyonu**

Son konsantrasyonları N-lauroilsarkozin için %1 (wt/vol), EDTA (pH: 9.5) için 0.5 M ve Proteinaz K için 500 µg/µL olacak şekilde hücre lizis tamponu hazırlandı. Her bir örnek için 5 mL hücre lizis tamponu 10 mL’lik *Falcon* tüplere koyuldu. Katılaştıran agaroz,



kalıplardan çıkarılarak içinde hücre lizis tamponu bulunan tüplere koyuldu ve 56°C’de bir gece inkübe edildi (183-185).

İnkübasyon süresinin sonunda tüpler buz içerisinde yaklaşık 15 dakika bekletildi ve agarozların yeniden katılaşması sağlandı. Lizis solüsyonu aspire edildi. Agaroz kalıbı 50 mL’lik *Falcon* tüpe aktarıldı. Üzerine 4 mL 50°C’ye ısıtılmış steril ultra saf su eklendi ve 50°C’de çalkalamalı su banyosunda 15 dakika inkübe ederek yıkandı. Bu işlem toplamda üç kez distile su ve üç kez TE tamponu kullanılarak tekrarlandı (183-186).

#### **3.2.1.4.4. DNA’nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi**

Agaroz kalıbının yaklaşık ¼’ü bistüri kullanılarak kesildi ve 1.5 mL’lik santirüfüj tüpünlerine koyuldu. Her bir örnek için 200 mL *SpeI* tamponu eklendi. 30°C’de çalkalamalı su banyosunda 10 dakika inkübasyonun ardından tampon pipet yardımıyla aspire edildi. Sonrasında üzerine her bir izolat için 200 µL *SpeI* enzim karışımı koyuldu. Çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edildi. İçinde agaroz bulunan bu tüpler 4°C’de 15 dakika bekletildi (187).

#### **3.2.1.4.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması**

100 mL 0.5xTBE tamponu içerisinde 1.2 g *pulsed-field certified agarose plus*’ın çözülmesi ile %1.2 (wt/vol) yoğunlukta elektroforez jeli hazırlandı. Elektroforez için hazırlanmış olan agaroz soğuması için 45-50°C’ye ayarlanmış olan su banyosunda bekletildi. Elektroforez için hazırlanan agarozun döküleceği kaset eğimi kontrol edilmiş bir zemine yerleştirildi. 15 dişli elektroforez tarağının dişlerinin her birinin uç kısmına agarozlar ve marker yerleştirildi. Agarozların etrafında kalan sıvı kurutma kâğıdı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra 5 dakika oda ısısında bekletildi. Elektroforez tarağı elektroforez jelinin döküleceği kasete yerleştirildi. 45-50°C’ye soğutulmuş olan elektroforez için hazırlanan agaroz hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kasete döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika bekletilerek katılaşması sağlandıktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel altındaki tabla yardımıyla kasetten çıkarıldı. İçerisinde 1900–2000 mL 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi (187-188).

### 3.2.1.4.6. Elektroforez

CHEF-DR III sistemi kullanılarak gerçekleştirilen elektroforez işleminin koşulları

- Başlangıç vuruş süresi 5 saniye,
- Bitiş vuruş süresi 35 sn,
- Vuruş açısı 120°,
- Akım 6 V/cm<sup>2</sup>,
- Sıcaklık 11°C,
- Toplam süre 24 saat olacak şekilde ayarlandı (187-188).

### 3.2.1.4.7. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

Elektroforez işlemi bittiğinde 400 mL ultra saf suya 10 mg/mL'lik etidyum bromür solusyonundan 400 µL ilave edildi ve 10 µg/mL yoğunlukta etidyum bromür elde edildi. Jel bu solusyon içinde 30 dakika boyandı ve sonrasında ise 400 mL ultra saf su içerisinde 45 dakika bekletilerek boyadan arındırıldı (188). VersaDoc™ görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışık altında elde edilen DNA bantları görüntülendi ve fotoğrafı çekildi. Tenover ve ark. (189) tarafından önerilen kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi (46,189). Quantity One-4.6.5 analiz programı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak dendogram analizleri yapıldı. Analiz sonucunda %85 benzerlik ( $\leq 3$  bant fark) olan izolatlar yakın ilişkili kabul edildi (190,191).

### 3.2.2. Klinik Özelliklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Metallo beta laktamaz varlığının; yaş, cinsiyet, yattığı servis türü, enfeksiyonun polimikrobiyal olup olmaması, enfeksiyon bölgesi, beraberinde başka bir enfeksiyon varlığı, enfeksiyonun ilk 48 saatinde yoğun bakım servisinde yatış, enfeksiyonla ilişkili sepsis ya da septik şok, eşlik eden hastalık, son 30 günde hospitalizasyon, geçirilmiş cerrahi ya da travma, immünoşüpresif ilaç kullanımı ve hastaya verilen antibiyoterapi gibi faktörlerle ilişkisi ve hastanede yatış süresi ve mortalite üzerine etkisi SPSS 13.0 programı (SPSS Inc., ABD) kullanılarak değerlendirildi. İkili karşılaştırmaların değerlendirmesinde sayısal verilerin normal dağılıma uyup uymadığı One Sample Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılıma uyuyorsa Student *t* testi, normal dağılıma uymuyorsa

Mann-Whitney U testi; niteliksel karşılaştırmalar için ise Ki-kare testi kullanıldı. Hayatta kalabilme analizi (Survival analysis) için Kaplan-Meier testi uygulandı. Yapılan analiz sonucu  $p$  değeri  $<0.05$  olarak bulunan değişkenler MBL pozitif *P. aeruginosa* ile ilişkisi açısından anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

#### 4.1.1 İzolatların Servislere Göre Dağılımı

Tablo 12’de verildiği gibi imipenem ya da meropenem orta duyarlı/dirençli 334 *P. aeruginosa* izolatının 120’si (%35.9) 2010, 115’i (%34.4) 2009 ve 99’u (%29.6) 2008 yılında gönderilmiş örneklerden izole edildi. İzolatların 171’i (%51.8) yoğun bakım servislerinde, 117’si (%35.9) çeşitli servislerde ve 41’i (% 12. 3) değişik polikliniklerde takip edilen hastalardan izole edildi.

**Tablo 12. Çalışma izolatlarının birimlere ve yıllara göre dağılımı**

		2010	2009	2008	Toplam	
					Sayı	%
<b>Poliklinikler</b>	Acil Poliklinik	0	3	5	8	2.4
	Beyin Cerrahisi Polikliniği	0	0	1	1	0.3
	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	3	5	0	8	2.4
	Gastroenteroloji Polikliniği	0	0	1	1	0.3
	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	2	6	1	9	2.7
	Ortopedi Polikliniği	1	1	2	4	1.2
	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği	1	0	0	1	0.3
	Pediyatrik Nefroloji Poliklinik	0	1	1	2	0.6
	Plastik Cerrahi Polikliniği	1	0	0	1	0.3
	Üroloji Polikliniği	1	2	2	5	1.5
	Yenidoğan Polikliniği	0	0	1	1	0.3
	Toplam	Sayı	9	18	14	41
	%	2.7	5.4	4.2		12.3
<b>Servisler</b>	Acil Servis	0	0	1	1	0.3
	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi	3	1	2	6	1.8
	Dahiliye Hematoloji Servisi	0	1	1	2	0.6
	Dahiliye Nefroloji Servisi	0	1	0	1	0.3
	Dahiliye Onkoloji Servisi	2	2	0	4	1.2

Tablo 12'nin devamı

Dahiliye-1 Servisi	2	1	1	4	1.2
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	0	3	1	4	1.2
Genel Cerrahi Servisi	6	4	1	11	3.3
Göğüs Cerrahisi Servisi	0	1	0	1	0.3
Göğüs Hastalıkları Servisi	2	4	2	8	2.4
Kadın Doğum Servisi	1	0	0	1	0.3
Kalp Damar Cerrahi Servisi	1	0	0	1	0.3
Kardiyoloji Servisi	3	3	2	8	2.4
Kulak Burun Boğaz Servisi	1	3	4	8	2.4
Nöroloji Servisi	2	2	0	4	1.2
Ortopedi Servisi	1	1	7	9	2.7
Pediyatri Adölesan Servisi	2	0	3	5	1.5
Pediyatri Enfeksiyon Servisi	5	2	2	9	2.7
Pediyatri Hematoloji Servisi	2	0	0	2	0.6
Pediyatri Süt Çocuğu Servisi	3	5	1	9	2.7
Pediyatrik Cerrahi Servisi	1	1	0	2	0.6
Plastik Cerrahi Servisi	1	1	2	4	1.2
Üroloji Servisi	1	0	2	3	0.9
Yanık Ünitesi	12	1	0	13	3.9
Toplam	Sayı	51	37	32	120
	%	15.3	11.0	9.6	35.9
<b>Yoğun Bakım Servisleri</b>					
Anestezi YBS	13	14	0	27	8.1
Cerrahi YBS	0	2	20	22	6.6
Dahiliye YBS	5	8	6	19	5.7
Göğüs Hastalıkları YBS	2	7	0	9	2.7
Kardiyovasküler Cerrahi YBS	2	1	0	3	0.9
Nöroloji YBS	9	8	5	22	6.6
Nöroşirurji YBS	4	12	11	27	8.1
Pediyatri YBS	9	0	0	9	2.7
Yenidoğan YBS	16	8	11	35	10.4
Toplam	Sayı	60	60	53	173
	%	18.0	18.0	15.8	51,8

2008 yılına ait 99 izolattın 14'ü (14.1) poliklinik, 32'si (%32.3) servis, 53'ü (53.6) yoğun bakım hastalarından; 2009 yılına ait 115 izolattın 18'i (%15.7) poliklinik, 37'si (%32.1) servis, 60'ı (%52.2) yoğun bakım hastalarından, 2010 yılına ait 120 izolattın ise 9'u (%7.5) poliklinik, 51'i (%42.5), 60'ı (%50.0) yoğun bakım hastalarından izole edilmiştir (Şekil 5).



**Şekil 5. İzolatların yıllara ve gönderildiği birimlere göre dağılımı**

#### 4.1.2. İzolatların Materyale Göre Dağılımı

İzolatların 165'i (%49.4) solunum yolu örneklerinden, 63'ü (%18.9) genitoüriner sistem örneklerinden, 59'u (%17.6) cilt ve yumuşak doku örneklerinden, 28'i (%8.4) kan örneklerinden ve 19'u (%5.7) diğer örneklerden izole edilmiştir (Tablo 13).

**Tablo 13. Çalışma izolatlarının izole edildiği materyallere göre dağılımı**

Materyal	Sayı	%	
<b>Solunum Yolu</b>	Balgam	10	3.0
	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	3	0.9
	Trakeal aspirat	152	45.5
	<b>Toplam</b>	<b>165</b>	<b>49.4</b>
<b>Genitoüriner sistem</b>	İdrar	60	18.0
	Vajinal sürüntü	3	0.9
	<b>Toplam</b>	<b>63</b>	<b>18.9</b>
<b>Cilt ve Yumuşak Doku</b>	Ameliyat materyali	1	0.3
	Apse	7	2.1
	Diren	4	1.2
	Püy	2	0.6
	Yanık sürüntü	8	2.4
	Yara sürüntü	37	11.0
<b>Toplam</b>	<b>59</b>	<b>17.6</b>	
<b>Kan akımı</b>	Kan	21	6.3
	Kanül	1	0.3
	Katater	6	1.8
	<b>Toplam</b>	<b>28</b>	<b>8.4</b>
<b>Diğer</b>	Safra	2	0.6
	Torosentez sıvısı	1	0.3
	Parasentez sıvısı	1	0.3

Tablo 13'ün devamı

Ağız içi lezyon sürüntüsü	1	0.3
Burun sürüntüsü	1	0.3
Konjonktiva sürüntüsü	2	0.6
Kulak sürüntüsü	11	3.3
Toplam	19	5.7

#### 4.1.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolatların; piperasilin, seftazidim, sefepim, aztreonam, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, amikasin, siprofloksasin, imipenem ve meropenem için antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Çalışma izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolat Kodu	PRL	CAZ	FEP	ATM	TZP	GN	AK	CIP	IMP	MEM
PA1	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA2	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA3	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA4	S	S	I	R	S	S	S	S	R	I
PA5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PA6	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA7	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA8	R	R	R	I	R	S	S	S	I	S
PA9	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA10	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA11	R	I	S	R	R	R	I	S	S	R
PA12	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
PA13	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA14	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
PA15	S	S	R	R	S	I	S	S	R	R
PA16		S	I	R	S	I	S	R	S	R
PA17	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA18	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA19	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
PA20	I	S	S	I	S	S	S	S	R	R
PA21	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
PA22	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
PA23	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA24	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA25	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA26	S	I	R	R	S	I	S	R	R	R

Tablo 14'ün devamı

PA27	S	I	R	R	S	S	S	I	S	I
PA28	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA29	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
PA30	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA31	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R
PA32	S	S	R	R	S	S	S	I	S	I
PA33	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R
PA34	S	I	R	R	S	R	R	R	I	S
PA35	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R
PA36	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R
PA37	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA38	S	I	R	R	S	S	S	I	S	I
PA39	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
PA40	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
PA41	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R
PA42	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA43	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA44	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R
PA45	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R
PA46	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I
PA47	S	S	S	I	S	S	S	S	I	R
PA48	S	S	I	R	S	S	S	S	R	I
PA49	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA50	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA51	S	S	R	R	S	I	S	R	R	R
PA52	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R
PA53	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R
PA54	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
PA55	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
PA56	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
PA57	R	S	R	R	S	I	S	R	R	R
PA58	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA59	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA60	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R
PA61	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA62	S	S	R	R	S	R	S	R	R	I
PA63	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA64	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA65	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
PA66	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
PA67	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA68	S	I	I	R	S	S	S	I	R	R
PA69	R	I	S	S	S	R	I	S	R	R
PA70	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I
PA71	S	I	S	S	S	R	R	S	R	R



Tablo 14'ün devamı

PA72	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA73	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
PA74	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
PA75	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R
PA76	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA77	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA78	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
PA79	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
PA80	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PA81	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I
PA82	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA83	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA84	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA85	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA86	S	I	R	R	S	I	S	S	R	R
PA87	S	I	I	R	S	S	S	S	R	R
PA88	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
PA89	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA90	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA91	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA92	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA93	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA94	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA95	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA96	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R
PA97	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA98	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S
PA99	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
PA100	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
PA101	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
PA102	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA103	S	R	I	R	R	S	S	S	R	I
PA104	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA105	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R
PA106	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
PA107	R	R	S	R	R	S	S	I	R	R
PA108	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA109	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
PA110	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA111	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA112	S	I	S	I	S	S	S	S	I	S
PA113	R	I	S	R	S	R	R	S	S	R
PA114	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
PA115	I	S	S	R	S	S	S	I	R	I
PA116	R	I	I	R	S	S	S	R	R	R



Tablo 14'ün devamı

PA132	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA133	R	R	I	I	I	S	R	I	R	R
PA134	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA135	I	S	S	S	I	S	S	S	R	I
PA136	I	S	S	R	I	S	R	R	I	R
PA137	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA138	I	I	I		I	S	S	S	I	R
PA139	S	I	I	I	S	S	S	S	R	R
PA140	S	S	S	R	S	S	R	S	R	I
PA141	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I
PA142	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
PA143	R	S	R	R	S	R	R	S	I	R
PA144	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA145	R	S	R	R	S	I	R	R	I	R
PA146	I	R	R	R	I	R	R	S	R	R
PA147	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA148	S	I	S	I	S	S	S	R	I	R
PA149	R	R	R	S	R	S	R	R	I	R
PA150	I	R	I	S	S	S	S	R	S	R
PA151	R	R	R	S	I	S	S	S	R	R
PA152	R	I	I	R	R	S	S	I	R	R
PA153	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R
PA154	I	S	I	S	I	R	S	I	R	R
PA155	I	I	I	S	I	S	S	I	I	R
PA156	I	R	R	R	S	R	R	R	I	R
PA157	R	S	R	R	R	I	R	R	I	R
PA158	R	I	R	S	R	I	S	R	R	R
PA159	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
PA160	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I
PA161	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
PA162	R	I	R	R	R	I	I	R	R	R
PA163	R	I	R	R	R	I	R	R	I	R
PA164	R	R	R	I	S	S	R	S	R	S
PA165	I	I	R	S	I	S	S	R	I	R
PA166	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA167	R	R	I	I	R	S	S	R	I	R
PA168	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
PA169	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA170	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R
PA171	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
PA172	S	S	S	S	I	S	S	S	I	I
PA173	S	S	R	S	S	R	S	S	S	I
PA174	S	I	R	S	S	S	S	S	R	R
PA175	I	I	I	S	I	S	S	S	R	S
PA176	R	I	I		R	S	S	S	R	I

Tablo 14'ün devamı

PA177	R	R	R	I	R	S	S	I	R	I
PA178	R	R	I	S	I	I	S	I	I	S
PA179	R	I	I	S	R	S	S	R	I	I
PA180	I	S	S	R	I	S	S	S	I	R
PA181	R	R	R	S	R	I	I	I	I	S
PA182	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S
PA183	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
PA184	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R
PA185	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
PA186	I	S	S	S	I	S	S	S	R	I
PA187	R	I	I	I	R	S	S	I	I	R
PA188	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PA189	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R
PA190	I	I	I	I	I	S	S	S	I	R
PA191	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
PA192	R	R	R	R	I	R	S	S	I	R
PA193	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA194	R	R	R	S	R	I	S	I	R	R
PA195	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
PA196	R	R	R	R	I	R	I	S	I	R
PA197	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
PA198	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
PA199	R	R	I		R	S	S	I	R	R
PA200	R	R	R	R	R	I	S	S	I	I
PA201	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA202	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA203	R	I	R	R	R	I	S	R	I	R
PA204	I	I	I	S	I	S	S	S	R	R
PA205	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S
PA206	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
PA207	R	S	S	S	S	R	S	S	I	R
PA208	R	S	I	S	R	R	S	S	R	R
PA209	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA210	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R
PA211	I	S	S	S	I	S	S	S	R	R
PA212	I	S	S	I	I	S	S	I	I	R
PA213	R	R	I	R	R	S	S	R	R	I
PA214	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
PA215	R	S	I	I	R	R	S	S	R	R
PA216	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA217	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA218	R	R	I	S	R	S	S	I	R	R
PA219	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA220	I	R	R	S	I	R	S	R	I	R
PA221	R	R	I	R	I	R	S	S	I	I

Tablo 14'ün devamı

PA222	R	R	R	R	I	R	S	R	I	R
PA223	I	S	S	I	I	R	S	S	I	R
PA224	R	S	I	S	R	R	S	R	I	R
PA225	R	R	I	S	R	R	R	S	R	R
PA226	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA227	I	R	R	I	S	R	I	R	R	R
PA228	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA229	S	R	R	R	S	S	S	R	I	I
PA230	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA231	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA232	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA233	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
PA234	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R
PA235	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S
PA236	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PA237	S	S	I	S	R	S	S	S	R	S
PA238	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
PA239	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA240	R	I	R	R	S	R	R	R	I	R
PA241	S	I	R	R	R	S	S	R	R	R
PA242	S	R	I	I	S	R	S	R	R	S
PA243	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA244	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA245	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA246	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA247	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA248	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
PA249	R	I	R	R	R	I	I	R	R	R
PA250	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA251	S	S	R	I	S	I	S	S	R	S
PA252	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PA253	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA254	R	R	R	I	R	S	S	S	I	S
PA255	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
PA256	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA257	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
PA258	R	R	R	I	R	S	S	S	R	I
PA259	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA260	S	S	R	R	S	I	S	S	R	R
PA261	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA262	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA263	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA264	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA265	S	S	R	S	S	I	S	S	R	I
PA266	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I

Tablo 14'ün devamı

PA267	S	S	I	R	S	S	S	R	S	I
PA268	R	R	S	I	S	R	R	R	I	
PA269	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA270	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
PA271	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I
PA272	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
PA273	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PA274	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA275	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA276	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
PA277	S	S	I	S	S	R	S	R	R	S
PA278	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA279	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA280	R	R	R	I	R	S	S	S	R	I
PA251	S	S	R	I	S	I	S	S	R	S
PA252	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PA253	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA254	R	R	R	I	R	S	S	S	I	S
PA255	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
PA256	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA257	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
PA258	R	R	R	I	R	S	S	S	R	I
PA259	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA260	S	S	R	R	S	I	S	S	R	R
PA261	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA262	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA263	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA264	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA265	S	S	R	S	S	I	S	S	R	I
PA266	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I
PA267	S	S	I	R	S	S	S	R	S	I
PA268	R	R	S	I	S	R	R	R	I	
PA269	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA270	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
PA271	R	R	R	R	R	I	S	S	R	I
PA272	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
PA273	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PA274	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA275	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA276	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
PA277	S	S	I	S	S	R	S	R	R	S
PA278	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA279	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA280	R	R	R	I	R	S	S	S	R	I
PA281	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I

Tablo 14'ün devamı

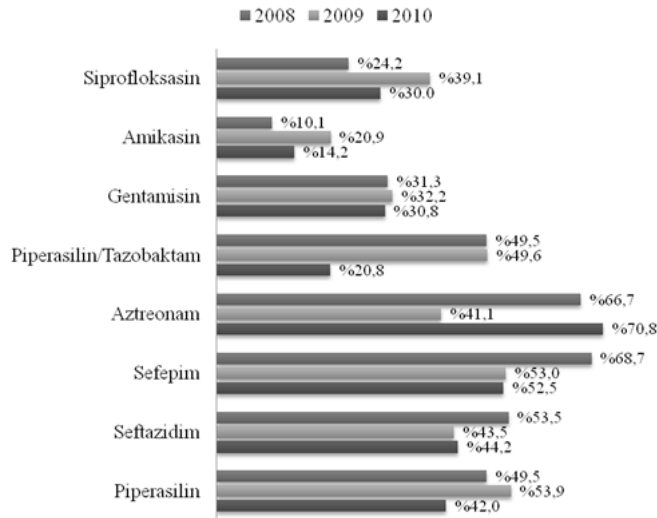
PA282	R	S	R	R	S	I	S	R	R	R
PA283	S	S	R	R	S	S	S	R	I	R
PA284	R	R	R	I	R	S	S	S	R	I
PA285	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R
PA286	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
PA287	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
PA288	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA289	R	R	R	I	R	S	S	S	R	S
PA290	S	R	R	R	S	R	S	S	R	I
PA291	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
PA292	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I
PA293	S	S	I	R	S	R	S	S	R	R
PA294	R	S	R	I	R	R	S	R	R	R
PA295	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I
PA296	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
PA297	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA298	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA299	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA 300	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
PA301	S	S	R	R	S	S	S	S	R	I
PA302	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S
PA303	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R
PA304	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA305	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
PA306	S	S	I	R	S	S	S	S	R	I
PA307	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I
PA308	I	S	S	S	I	S	S	S	S	R
PA309	I	I	I	S	I	I	S	R	R	R
PA310	I	I	I	S	I	S	S	S	R	I
PA311	I	S	S	S	I	R	S	S	I	I
PA312	I	S	S	S	I	S	S	S	I	I
PA313	I	I	I	I	I	I	S	S	R	R
PA314	R	I	I	S	I	R	S	S	R	S
PA315	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
PA316	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R
PA317	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
PA318	S	S	R	R	S	R	I	R	R	R
PA319	I	S	S	I	I	S	S	S	I	I
PA320	I	I	I	R	I	S	S	S	R	I
PA321	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
PA322	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
PA323	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S
PA324	R	S	S	R	I	S	S	I	I	S
PA325	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I
PA326	R	R	I	S	I	S	S	S	R	R

Tablo 14'ün devamı

PA327	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PA328	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R
PA329	I	S	S	S	I	S	S	R	S	R
PA330	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
PA331	I	I	I	S	I	S	S	R	R	R
PA332	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
PA333	I	R	I	S	I	S	R	S	R	S
PA334	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I

PRL: Piperasilin, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, GN: Gentamisin, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli.

Orta duyarlı/dirençli izolatların yıllara göre oranlarının piperasilin için %42.0-%53.9, piperasilin-tazobaktam için %20.8-%49.6, seftazidi için %43.5-%53.5, sefepim için %52.5-%68.7, aztreonam için %41.1-%70.8, gentamisin için %30.8-32.2, amikasin için %10.1-%20.9 ve siprofloksasilin için %24.2-%39.1 arasında değiştiği görüldü (Şekil 6).



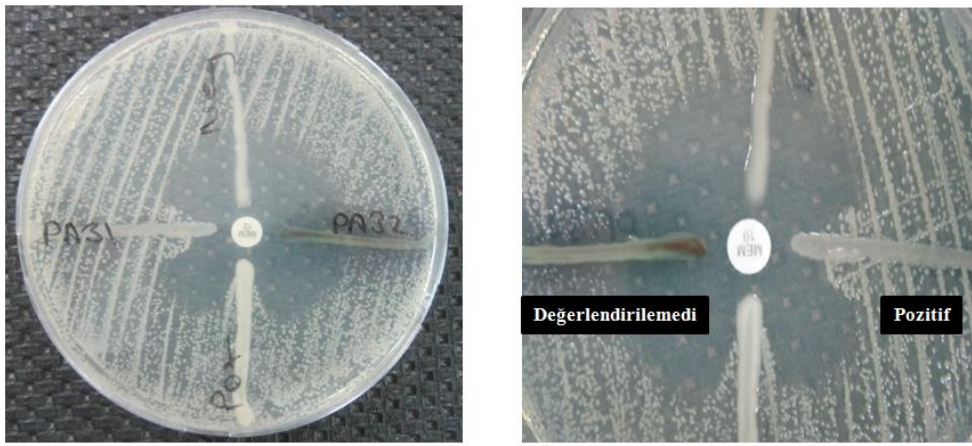
Şekil 6. Yıllara göre çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (antimikrobiyal duyarlılık test sonucu orta duyarlı bulunan izolatlar dirençli kabul edilmiştir).



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

##### 4.1.4.1. Modifiye Hodge Testi

İzolatların 21'inde (%6.3) Modifiye Hodge testi ile karbapenemaz üretimi tespit edildi (Resim 2). Modifiye Hodge test sonuçlarına bakıldığında çalışmamıza dahil edilen izolatların yıllara göre karbapenemaz üretim oranı %0.9 ila %14.2 arasında değişmektedir (Tablo 15).



**Resim 2. MBL üretiminin Modifiye Hodge testi ile araştırılması**

**Tablo 15. Modifiye Hodge testi sonuçları**

	Pozitif		Değerlendirilemedi		Negatif	
	n	%	n	%	n	%
2010 (n: 120)	17	14.2	54	45.0	49	40.8
2009 (n: 115)	1	0.9	48	41.7	66	57.4
2008 (n: 99)	3	3.0	52	52.5	44	44.4
<b>TOPLAM (n:334)</b>	<b>21</b>	<b>6.3</b>	<b>154</b>	<b>46.1</b>	<b>159</b>	<b>47.6</b>

##### 4.1.4.2 Kombine Disk Testi

İzolatların 109'unda (%32.6) imipenem/imipenem+EDTA kombine disk metodu ile MBL üretimi saptandı (Resim 3). Kombine disk testi sonuçlarına bakıldığında çalışmamıza dahil edilen izolatların yıllara göre MBL üretim oranı %23.2 ila %37.4 arasında değişmektedir (Tablo 16).



**Resim 3. MBL üretiminin kombine disk testi ile araştırılması**

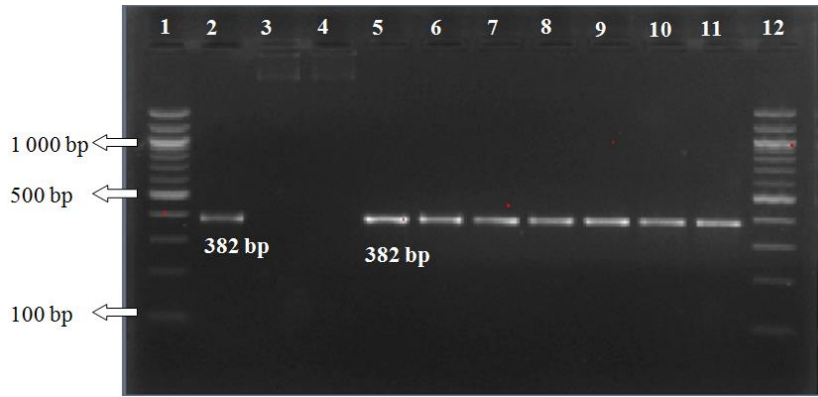
**Tablo 16. İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi sonuçları**

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
2010 (n: 120)	43	35.8	77	64.2
2009 (n: 115)	43	37.4	72	62.6
2008 (n: 99)	23	23.2	76	76.8
<b>TOPLAM (n: 334)</b>	<b>109</b>	<b>32.6</b>	<b>225</b>	<b>67.4</b>

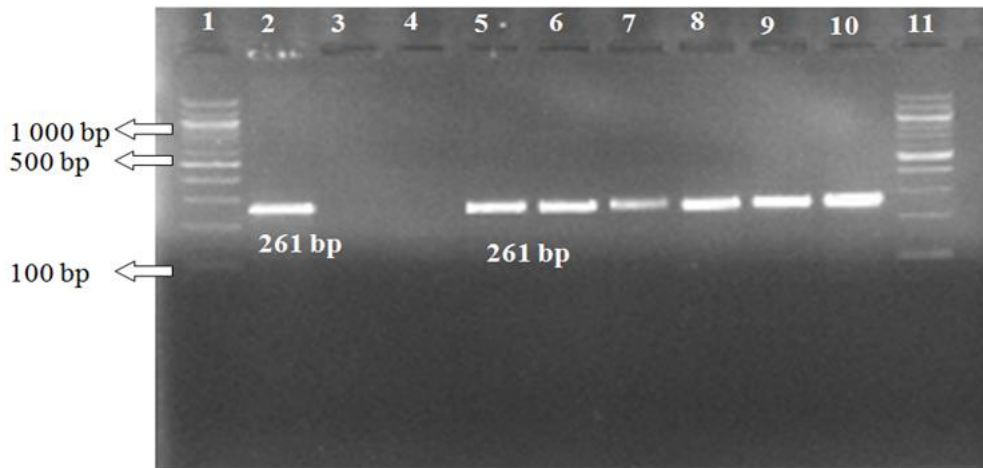
#### 4.1.5. Metallo Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması

##### 4.1.5.1. *bla<sub>VIM</sub>* Geninin PZR ile Araştırılması

*bla<sub>VIM</sub>* (A) ve *bla<sub>VIM</sub>* (B) genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda sırasıyla 23 izolatta 382 bp büyüklüğünde (Resim 4) ve 6 izolatta 261 bp büyüklüğünde (Resim 5) PZR ürünü tespit edildi. *bla<sub>VIM</sub>* (A) primeri ile VIM tipi MBL saptanan 23 izolatın yalnız 6'sında *bla<sub>VIM</sub>* (B) primeri ile VIM tipi MBL tespit edildi (Tablo 16).



**Resim 4.  $bla_{VIM}$  (A) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü; 1 ve 12: DNA marker, 2: Pozitif kontrol (*P. aeruginosa* 670448), 3: Negatif kontrol (ddw), 4: Negatif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853), 5: PA14, 6: PA19, 7: PA143, 8: PA146, 9: PA156, 10: PA170, 11: PA206.**



**Resim 5.  $bla_{VIM}$  (B) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü; 1 ve 11: DNA marker, 2: Pozitif kontrol (*P. aeruginosa* 670448), 3: Negatif kontrol (ddw), 4: Negatif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853), 5: PA14, 6: PA19, 7: PA170, 8: PA206, 9: 237, 10: 254.**

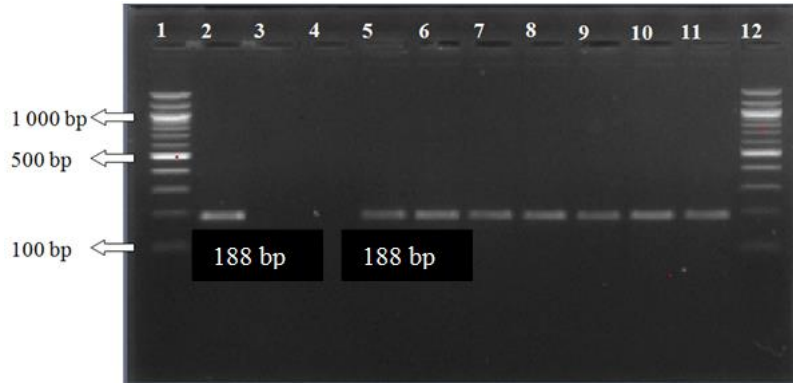
**Tablo 17. PZR ile  $bla_{VIM}$  tespit edilen izolatlar**

	$bla_{VIM}$ (A) (382 bp)			$bla_{VIM}$ (B) (261bp)		
	İzolat Kodu	Sayı	%	İzolat Kodu	Sayı	%
2010 (n: 120)	PA14, PA19, PA43	3	2.5	PA14, PA19	2	1.7
2009 (n: 115)	PA143, PA146, PA152, PA156, PA170, PA206, PA230	7	6.1	PA170, PA206	2	1.7
2008 (n: 99)	PA236, PA237, PA238, PA240, PA241, PA254, PA259, PA272, PA277, PA282, PA298, PA306, PA328	13	13.1	PA237, PA254	2	2.0
<b>TOPLAM (n:334)</b>		<b>23</b>	<b>6.9</b>		<b>6</b>	<b>1.8</b>

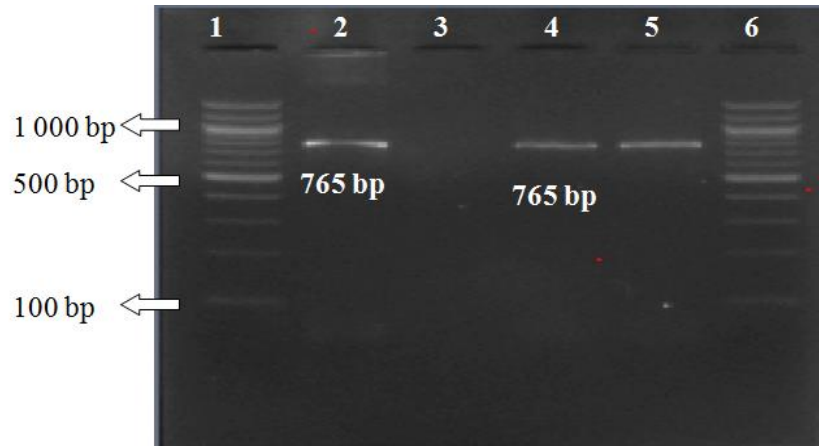
VIM tipi MBL saptanan PA14, PA19, PA146, PA206 kodlu izolatlar çeşitli pediatri servislerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. PA43, PA230, PA237, PA238, PA241, PA254, PA259, PA272, PA282, PA298, PA306, PA328 kodlu izolatlar çeşitli servislerde yatan erişkin hastalardan izole edilmiştir. PA152, PA 143, PA156, PA170, PA236, PA240, PA277 kodlu izolatlar ise çeşitli polikliniklerde takip edilen erişkin hastalardan izole edilmiştir.

#### 4.1.5.2. *bla*<sub>IMP</sub> Geninin PZR ile Araştırılması

*bla*<sub>IMP</sub> (A) ve *bla*<sub>IMP</sub> (B) genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda sırasıyla 12 izolatta 188 bp büyüklüğünde (Resim 6) ve 3 izolatta 765 bp büyüklüğünde (Resim 7) PZR ürünü saptandı. *bla*<sub>VIM</sub> (A) primeri ile IMP tipi MBL saptanan 12 izolattın yalnız 3'ünde *bla*<sub>IMP</sub> (B) primeri ile IMP tipi MBL saptandı. 2008 yılında izole edilen 115 *P. aeruginosa* izolatının hiç birinde PZR ile IMP tipi MBL tespit edilmedi (Tablo 18).



**Resim 6.** *bla*<sub>IMP</sub> (A) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü; 1 ve 12: DNA marker, 2: Pozitif kontrol (*P. aeruginosa* 587585), 3: Negatif kontrol (ddw), 4: Negatif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853), 5: PA31, 6: PA33, 7: PA35, 8: PA143, 9: PA145, 10 PA146, 11 PA156.



**Resim 7. *bla*<sub>IMP</sub> (B) primeri ile gerçekleştirilen PZR'nin elektroforez görüntüsü; 1 ve 6: DNA marker, 2: Pozitif kontrol (*P. aeruginosa* 587585), 3: Negatif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853), 4: PA31, 5: PA33.**

**Tablo 18. PZR ile *bla*<sub>IMP</sub> tespit edilen izolatlar**

	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> (A)		<i>bla</i> <sub>IMP</sub> (B)			
	İzolat Kodu	Sayı	%	İzolat Kodu	Sayı	%
2010 (n: 120)	PA31, PA33, PA35	3	2.5	PA31, PA33, PA35	3	2.5
2009 (n:115)	PA136, PA139, PA140, PA143, PA145, PA146, PA156, PA157, PA166	9	7.8	-	0	0
2008 (n: 99)	-	0	0	-	0	0
<b>TOPLAM (n: 334)</b>		<b>12</b>	<b>3,6</b>		<b>3</b>	<b>0,9</b>

IMP tipi MBL saptanan izolatlardan PA31, PA33, PA35, PA146 kodlu izolatlar çeşitli pediatri servislerinde yatan hastalardan izole edildi. PA136, PA139, PA140, PA145, PA166 kodlu izolatlar çeşitli servislerde yatan erişkin yaş hastalardan izole edilmiştir. PA143, PA156, PA157 kodlu izolatlar ise çeşitli polikliniklerde takip edilen erişkin yaş hastalardan izole edildi.

#### 4.1.5.3. *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> Genlerinin PZR ile Araştırılması

Çalışmaya alınan 334 *P. aeruginosa* izolatının hiç birinde *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PZR ile ilgili gen bölgelerinin hiçbiri tespit edilmedi.

#### 4.1.6. MBL Tespitinde Fenotipik Testlerin PZR ile Karşılaştırılması

##### 4.1.6.1. MBL Tespitinde Modifiye Hodge Testinin PZR ile Karşılaştırılması

Modifiye Hodge test ve PZR yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 19'da verilmiştir.

**Tablo 19. MBL tespitinde Modifiye Hodge testinin PZR ile karşılaştırılması**

		PZR*		Toplam
		Pozitif	Negatif	
MHT**	Pozitif	6 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>	21
	Negatif	9 <sup>c</sup>	150 <sup>d</sup>	159
	Değerlendirilemedi	17	137	154
	Toplam	32	302	334

MHT: Modifiye Hodge testi, \*: Altın standart kabul edilen yöntem, \*\*: Denenecek yöntem, <sup>a</sup>: Gerçek pozitif, <sup>b</sup>: Yalancı pozitif, <sup>c</sup>: Yalancı negatif, <sup>d</sup>: Gerçek negatif.

Duyarlılık:  $[\text{Gerçek pozitif} / (\text{Gerçek pozitif} + \text{Yalancı negatif})] \times 100$

Modifiye Hodge testi için duyarlılık:  $[6 / (6 + 9)] \times 100 = 40.0$

Özgüllük:  $[\text{Gerçek negatif} / (\text{Yalancı pozitif} + \text{Gerçek negatif})] \times 100$

Modifiye Hodge testi için özgüllük:  $[137 / (9 + 150)] \times 100 = 86.2$

Pozitif prediktif değer:  $[\text{Gerçek pozitif} / (\text{Gerçek pozitif} + \text{Yalancı pozitif})] \times 100$

Modifiye Hodge testi için pozitif prediktif değer:  $[6 / (6 + 15)] \times 100 = 28.6$

Negatif prediktif değer:  $[\text{Gerçek negatif} / (\text{Gerçek negatif} + \text{Yalancı negatif})] \times 100$

Modifiye Hodge testi için negatif prediktif değer:  $[9 / (9 + 150)] \times 100 = 5.7$

##### 4.1.6.2. MBL tespitinde kombine disk testinin PZR ile karşılaştırılması

Kombine disk test ve PZR yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 20'de verilmiştir.

**Tablo 20. MBL tespitinde kombine disk testinin PZR ile karşılaştırılması**

		PZR*		Toplam
		Pozitif	Negatif	
KDT**	Pozitif	29 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	109
	Negatif	3 <sup>c</sup>	222 <sup>d</sup>	225
	Toplam	32 <sup>e</sup>	302 <sup>f</sup>	334

\*: Altın standart kabul edilen yöntem, \*\*: Denenecek yöntem, <sup>a</sup>: Gerçek pozitif, <sup>b</sup>: Yalancı pozitif, <sup>c</sup>: Yalancı negatif, <sup>d</sup>: Gerçek negatif, <sup>e</sup>: MBL pozitifler, <sup>f</sup>: MBL negatifler

Duyarlılık: [Gerçek pozitif / (Gerçek pozitif + Yalancı negatif)] x 100

Kombine disk testi için duyarlılık: [29 / (29 + 3)] x 100 = 90.6

Özgüllük: [Gerçek negatif / (Yalancı pozitif + Gerçek negatif)] x 100

Kombine disk testi için özgüllük: [222 / (80 + 222)] x 100 = 73.5

Pozitif prediktif değer: [Gerçek pozitif / (Gerçek pozitif + Yalancı pozitif)] x 100

Kombine disk testi için pozitif prediktif değer: [29 / (29 + 80)] x 100 = 26.6

Negatif prediktif değer: [Gerçek negatif / (Gerçek negatif + Yalancı negatif)] x 100

Kombine disk testi için negatif prediktif değer: [222 / (222 + 3)] x 100 = 98.7

#### 4.1.7. MBL Tespit Edilen İzolatlarda Klonal İlişkinin Araştırılması

##### 4.1.7.1. Pediatrik Yaş Grubu Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması

Pediatrik yaş grubu hastaların izolatlarında üçünde VIM, dördünde IMP ve birinde ise hem IMP hem de VIM tipi MBL saptandı (Tablo 21).

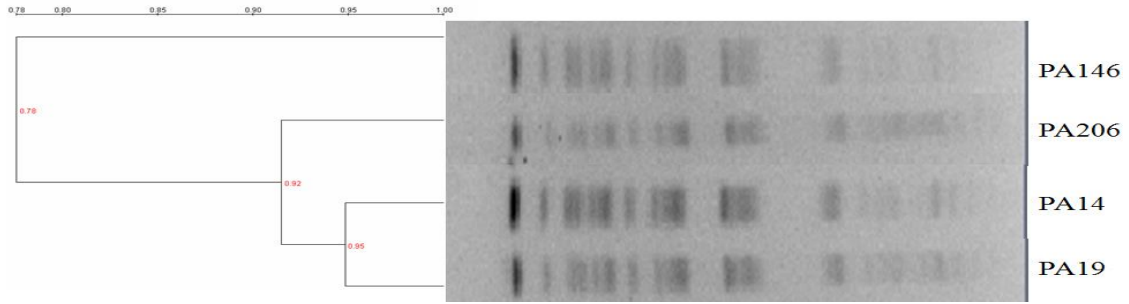
**Tablo 21. Pediatrik yaş grubu yatan hastalardan izole edilen MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının özellikleri**

İzolat Kodu	Servis	İstem Tarihi	MHT	KDT	MBL
PA14	Pediatric Süt Çocuğu Servisi	02/2010	+	+	VIM
PA19	Pediatric Süt Çocuğu Servisi	02/2010	*	+	VIM
PA206	Pediatric Süt Çocuğu Servisi	08/2009	*	+	VIM
PA146	Pediatric Süt Çocuğu Servisi	03/2009	*	+	VIM+IMP
PA140	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi	02/2009	-	+	IMP
PA31	Pediatric Yoğun Bakım Servisi	04/2010	+	+	IMP
PA35	Pediatric Yoğun Bakım Servisi	04/2010	+	+	IMP
PA33	Pediatric Yoğun Bakım Servisi	04/2010	+	+	IMP

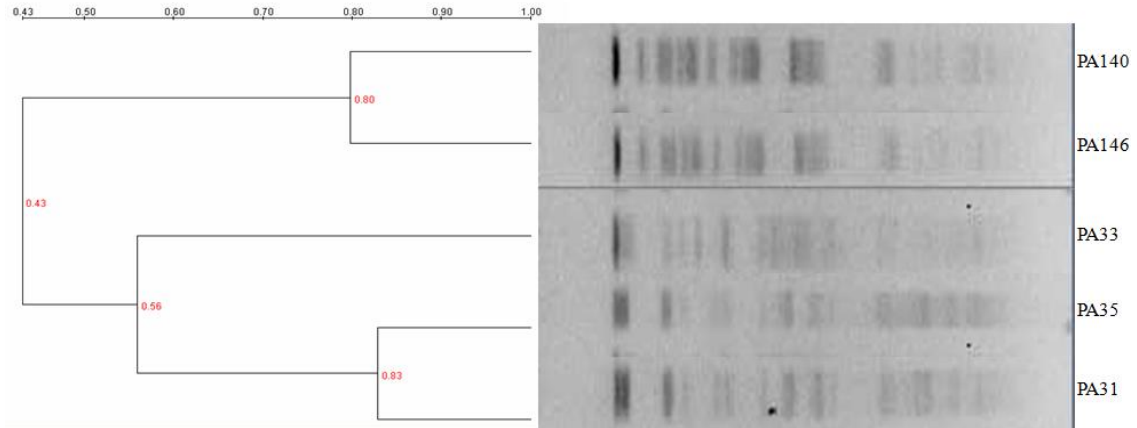
MHT: Modifiye Hodge testi, KDT: İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi, MBL: Metallo Beta Laktamaz, \*: Değerlendirilemedi.

VIM tipi MBL saptanan izolatlardan PA14, PA19, PA206, kodlu izolatlar %90 ve üzeri oranda klonal ilişkili ve aynı anda VIM ve IMP saptanan PA 146 ise bu grup ile %78 ilişkili bulundu (Şekil 7). IMP saptanan izolatlardan PA31 ile PA35 arasında %83 oranında; PA140 ile VIM ve IMP aynı anda pozitif olan PA146 arasında %80 oranında klonal ilişki tespit edildi (Şekil 8).

Pediyatrik hastaların izolatlarında, %85 üzeri klonal ilişki VIM pozitif olan üç izolatta (PA14, PA19, PA206) saptanmıştır. IMP pozitif izolatlarında saptanmadı.



**Şekil 7. Pediyatrik yaş grubu yatan hastalarının VIM tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları**



**Şekil 8. Pediyatrik yaş grubu yatan hastalarının IMP tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları.**



#### 4.1.7.2. Erişkin Yaş Grubu Yatan Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması

Erişkin yaş grubu yatan hastaların 13'ünde VIM ve 4'ünde IMP tipi MBL saptandı (Tablo 22).

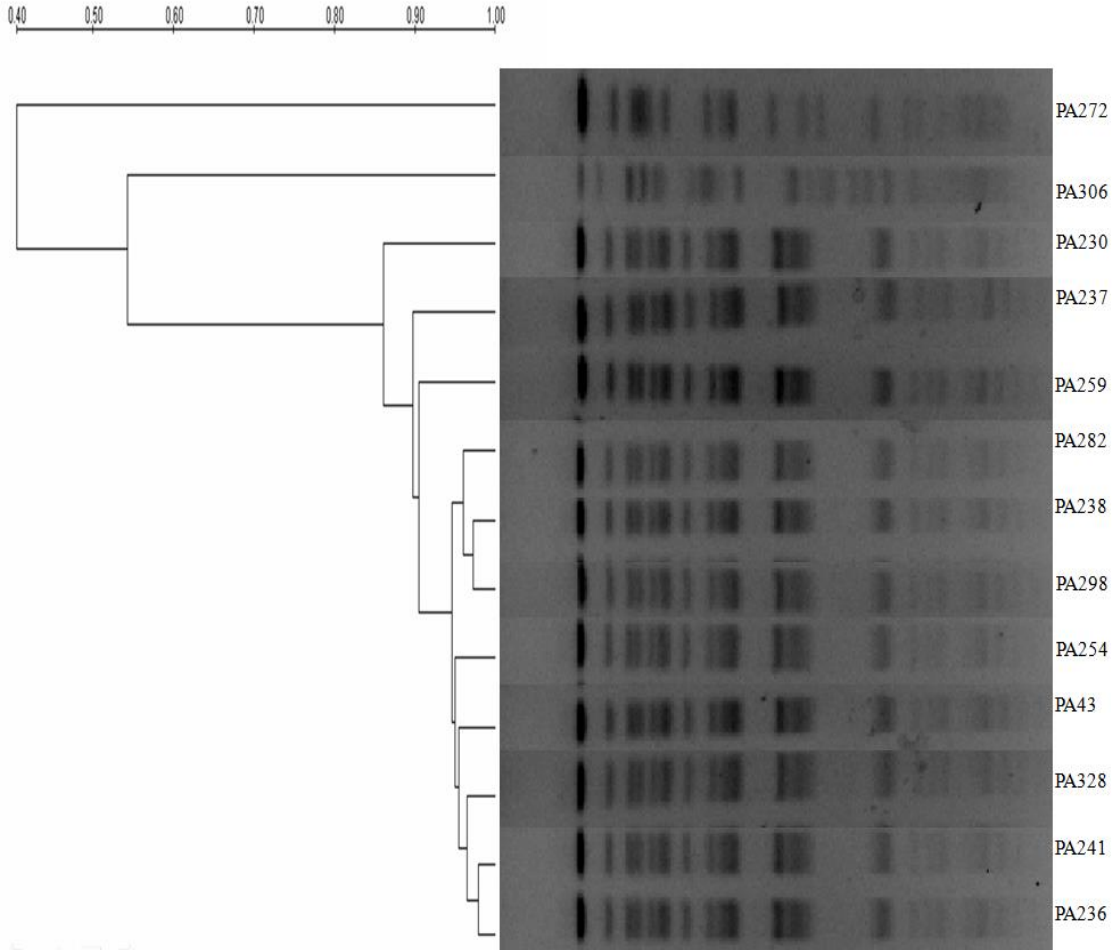
**Tablo 22. Erişkin yaş grubu yatan hastalardan izole edilen MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının özellikleri**

İzolat Kodu	Servis	İstem Tarihi	MHT	KDT	MBL
PA43	Yanık Ünitesi	05/2010	*	+	VIM
PA230	Anestezi Yoğun Bakım Servisi	12/2009	*	+	VIM
PA236	Ortopedi Servisi	01/2008	*	+	VIM
PA237	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi	01/2008	-	+	VIM
PA238	Dahiliye Servisi	01/2008	-	-	VIM
PA241	Plastik Cerrahi Servisi	02/2008	+	+	VIM
PA254	Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi	04/2008	*	+	VIM
PA259	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	05/2008	*	+	VIM
PA272	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	05/2008	-	-	VIM
PA282	Kardiyoloji Servisi	07/2008	*	+	VIM
PA298	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	09/2008	*	+	VIM
PA306	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	10/2008	-	+	VIM
PA328	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	12/2008	*	+	VIM
PA136	Plastik Cerrahi Servisi	02/2009	-	+	IMP
PA139	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi	02/2009	*	+	IMP
PA145	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi	03/2009	-	+	IMP
PA166	Genel Cerrahi Servisi	10/2009	*	+	IMP

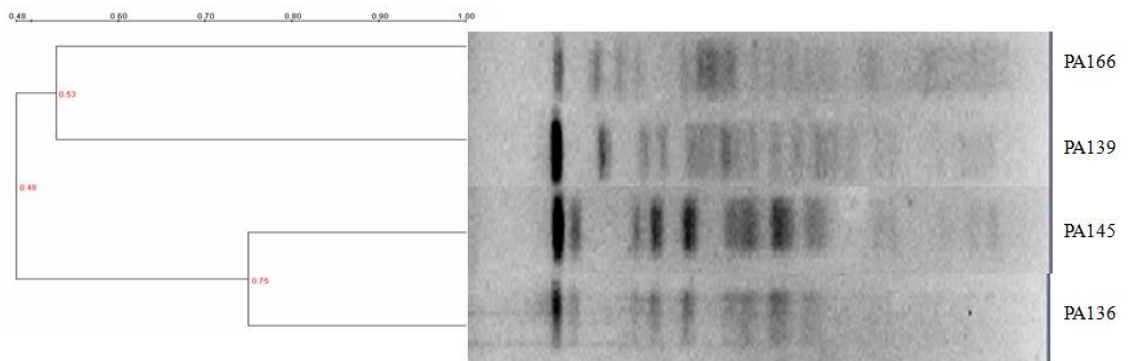
MHT: Modifiye Hodge testi, KDT: İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi, MBL: Metallo Beta Laktamaz, \*: Değerlendirilemedi.

VIM tipi MBL saptanan izolatlardan 11 tanesi (PA259, PA298, PA230, PA254, PA236, PA241, PA238, PA282, PA43, PA328) %90'a yakın oranda klonal ilişkili bulundu (Şekil 9). IMP saptanan PA145 ile PA166 arasında %75 oranında klonal ilişki tespit edildi (Şekil 10).

%85 ve üzeri klonal ilişki, erişkin yaş yatan hastaların VIM pozitif 11 izolatında (PA259, PA298, PA230, PA254, PA236, PA241, PA238, PA282, PA43, PA328) saptanırken IMP pozitif izolatlarında saptanmadı.



**Şekil 9.** Erişkin yaş grubu yatan hastalarının VIM tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları



**Şekil 10.** Erişkin yaş yatan hastalarının IMP tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları.

#### 4.1.7.3. Poliklinik Hastaların MBL Tespit Edilen İzolatlarında Klonal İlişkinin Araştırılması

Poliklinik hastalarının izolatlarından dördünde VIM, birinde IMP ve ikisinde hem IMP hem de VIM tipi MBL saptandı (Tablo 23).

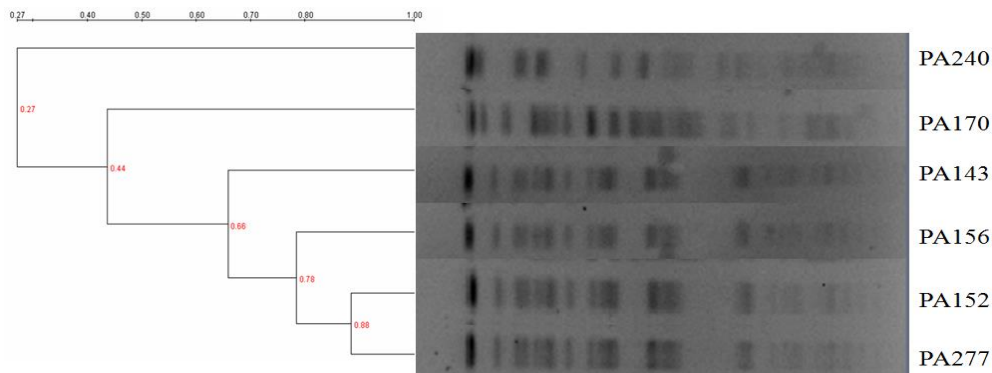
**Tablo 23. Erişkin yaş grubu poliklinik hastalardan izole edilen MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının özellikleri**

İzolat Kodu	Servis	İstem Tarihi	MHT	KDT	MBL
PA152	Üroloji Polikliniği	03/2009	-	+	VIM
PA170	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	05/2009	-	+	VIM
PA240	Acil Poliklinik	02/2008	+	-	VIM
PA277	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	06/2008	*	+	VIM
PA143	Acil Poliklinik	03/2009	*	+	VIM+ IMP
PA156	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	04/2009	*	+	VIM+ IMP
PA157	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	04/2009	-	+	IMP

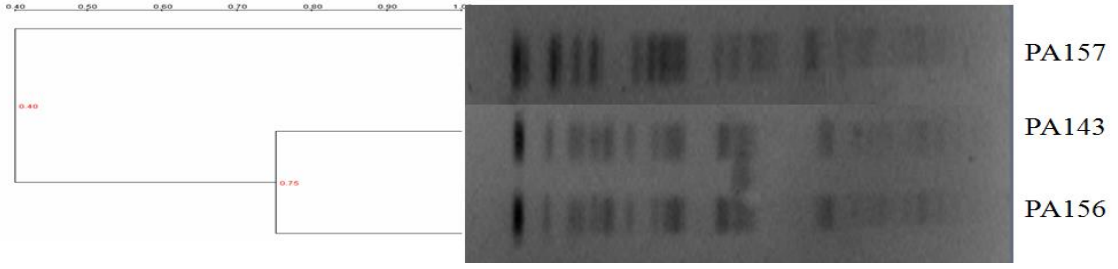
MHT: Modifiye Hodge testi, KDT: İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi, MBL: Metallo Beta Laktamaz, \*: Değerlendirilemedi.

VIM tipi MBL saptanan izolatlardan PA152, PA277 kodlu izolatlar %88 ve VIM ve IMP birlikte pozitif olan PA156 ise bunlarla %78 klonal ilişkili bulunmuştur (Şekil 11). Aynı anda VIM ve IMP saptanan izolatlardan, PA143 ile PA156 arasında %75 oranında klonal ilişki tespit edilmiştir (Şekil 12).

%85 ve üzeri klonal ilişki, erişkin yaş poliklinik hastalarının VIM pozitif iki izolatında (PA152, PA277) saptandı ancak IMP pozitif izolatlarda saptanmadı.



**Şekil 11. Poliklinik hastalarının VIM tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları**



**Şekil 12. Poliklinik hastalarının IMP tipi MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının PFGE profilleri ve dendrogram sonuçları.**

#### 4.2. Klinik Özellikler

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na 2008-2010 yıllarında gönderilmiş olan çeşitli klinik örneklerinden *P. aeruginosa* izole edilen 334 hastandan 158'inin dosya bilgilerine ve hastane kayıtlarına ulaşılabildi ve retrospektif olarak incelendi. Bu hastaların 23'ü 17 yaş ve altındaydı ve pediatrik yaş grubu olarak değerlendirmeye alındı. 135'i ise 18 yaş ve üzerindeki ve erişkin yaş grubu olarak değerlendirmeye alındı. Poliklinik hastalarının hiç birinin klinik bilgilerine ulaşamadığından bu hastalar için bir değerlendirme yapılamadı.

##### 4.2.1. MBL Üreten *P. aeruginosa* İzole Edilen Pediatrik Yaş Grubu Hastaların Demografik, Klinik ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Pediatrik yaş grubunda toplam 23 hastanın dosya ve klinik bilgilerine erişilebildi. Bu hastaların beşinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL tespit edildi ve vaka grubu olarak belirlendi. MBL negatif *P. aeruginosa* izole edilmiş olan 18 hasta ise kontrol grubu olarak belirlendi.

Hastaların hiçbirinde KF, nötropeni, konjenital immün yetmezlik ve AIDS tespit edilmedi. Hastaların hiçbirinde organ transplantasyon öyküsü saptanmadı. Hastaların hiçbirinde santral sinir sistemi ve intraabdominal enfeksiyon görülmedi.

Her iki grup arasında yaş, cinsiyet, yoğun bakımda yatış, enfeksiyondan önceki ve sonrasındaki hastanede yatış süresi, enfeksiyon bölgesi, enfeksiyonun polimikrobiyal olması, eşlik eden başka bir enfeksiyon, altta yatan hastalık, invaziv işlem, geçirilmiş

cerrahi, travma veya son 30 günde hospitalizasyon, son 30 günde aldığı antibiyoterapi ve immünoşüpresif tedavi açısından anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 24).

Pediyatrik yaş grubu hastalarının sayısının yetersiz olması nedeniyle survival analizi yapılamamıştır.

**Tablo 24. Pediyatrik yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitifliğinin demografik, klinik ve mikrobiyolojik özellikler ile ilişkisi**

	MBL pozitif Sayı (n: 5)	MBL negatif Sayı (n: 18)	<i>p</i> değeri
Demografik özellikler			
Yaş (yıl); Ort± StD	3.7±3.8	6.4±4.7	0.308
Erkek cinsiyet	7 (%70.0)	3 (%30.0)	0.618
Hastanede yatış			
Enfeksiyondan önceki 48 saatinde YBS’de yatış	2 (%22.2)	7 (%77.8)	1.000
YBS’de yatan hasta	2 (%20)	8 (%80.0)	1.000
Enfeksiyondan önceki yatış süresi (gün); Ort± StD	33.8±44.4	26.3±19.4	0.765
Enfeksiyondan sonraki yatış süresi (gün); Ort± StD	37.6±48.1	38.1±54.1	0.192
Enfeksiyon özellikleri			
ASYE	4 (%33.3)	8 (%66.7)	*
ÜSE	0	2 (%100.0)	*
Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu	0	4 (%100.0)	*
Kan akımı enfeksiyonu	0	2 (%100.0)	*
Birden fazla bölge enfeksiyonu	1 (%50)	1 (%50)	*
Diğer bölge enfeksiyonları <sup>a</sup>	0	1 (%100)	
Polimikrobiyal enfeksiyon	1 (%12.5)	7 (%87.5)	0.621
Eşlik eden başka bir enfeksiyon	0	11 (%100.0)	0.037
Enfeksiyonla ilişkili sepsis/septik şok	4 (%44.4)	5 (%55.6)	0.056
Altta yatan hastalık			
Herhangi bir veya daha fazla hastalık	5 (%76.2)	16 (%23.8)	1.000
Metabolik hastalık	2 (%50.0)	2 (%50.0)	0.194
Böbrek yetmezliği	0	2 (%100.0)	1.000
Kardiyovasküler hastalıklar	1 (%33.3)	2 (%66.7)	0.539
Pulmoner hastalık	0	1 (%100.0)	1.000
Nörolojik hastalık	2 (%13.3)	13 (%86.7)	0.297
Malignite	1 (%100.0)	0	1.000
Son 30 günde hospitalizasyon	3 (%15.8)	16 (%84.2)	0.194
Son 30 günde cerrahi işlem	1 (%14.3)	6 (%85.7)	1.000
Son 30 günde travma	0	3 (%100.0)	1.000
Son 30 günde immünoşüpresif tedavi	0	5 (%100)	0.545
İnvaziv işlem uygulaması			
Herhangi bir invaziv işlem	4 (%19.0)	17 (%81.0)	0.395
Santral ven kateterizasyonu	0	3 (%100.0)	1.000

Tablo 24'ün devamı

Üriner kateterizasyon	4	(%22.2)	14	(%77.8)	1.000
Mekanik ventilasyon	4	(%22.2)	14	(%77.8)	1.000
Total parenteral nütrisyon	3	(%50.0)	3	(%50.0)	0.089
Son 30 günde antibiyoterapi					
Herhangi bir antibiyotik kullanımı	5	(%22.7)	17	(%77.3)	1.000
Penisilinler	0		3	(%100)	1.000
1 ya da 2. kuşak sefalosporinler	0		1	(%100)	1.000
3. kuşak sefalosporinler	3	(%21.4)	11	(%78.6)	1.000
Karbapenemler	2	(%14.3)	12	(%85.7)	0.343
Aminoglikozidler	5	(%33.3)	10	(%66.7)	0.122
SXT	2	(%50.0)	2	(%50.00)	0.194
Tigesiklin	0		1	(%100)	1.000

ASYE: Alt solunum yolu enfeksiyonları, ÜSE: Üriner sistem enfeksiyonları, SXT: Trimetoprim-sulfametaksazol, <sup>a</sup>: Kulak, konjonktiva, vajen; <sup>b</sup>: Ventrikülo-Peritoneal şant, göğüs tüpü, nefrostomi, kolostomi, periton dializ katateri; Ort: Ortalama, StD: Standart Deviasyon, \*: *p* değeri hesaplanamadı.

#### 4.2.2. MBL Üreten *P. aeruginosa* İzole Edilen Erişkin Yaş Grubu Hastaların Demografik, Klinik ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Erişkin yaş grubunda toplam 135 hastanın dosya ve klinik bilgilerine erişilebildi. Bu hastaların 11'inden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL saptandı ve vaka grubu olarak belirlendi. MBL negatif *P. aeruginosa* izole edilmiş olan 124 hasta ise kontrol grubu olarak belirlendi.

Her iki grup arasında yaş, cinsiyet, yoğun bakımda yatış, enfeksiyondan önceki, enfeksiyon bölgesi, enfeksiyonun polimikrobiyal olması, eşlik eden başka bir enfeksiyon, altta yatan hastalık, invaziv işlem, geçirilmiş cerrahi, travma veya son 30 günde hospitalizasyon, son 30 günde aldığı antibiyoterapi ve immünoşüpresif tedavi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. MBL pozitif bulunan grupta enfeksiyondan sonra hastanede yatış süresinin daha uzun olduğu görüldü ( $p=0.049$ ) (Tablo 25).

**Tablo 25. Erişkin yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitifliğinin demografik, klinik ve mikrobiyolojik özellikler ile ilişkisi**

	MBL pozitif Sayı (n: 11)		MBL negatif Sayı (n: 124)		<i>p</i> değeri
Demografik özellikler					
Yaş (yıl); Ort± StD (Min-Max)	52.9±20.3		54.1±20.6		0.885
Erkek cinsiyet	10	%11.5	77	%88.5	0.096
Hastanede yatış					
YBS'de yatan hasta	5	6.6	71	93.4	0.533
Enfeksiyondan önceki 48 saatinde YBS'de yatış	5	6.4	73	93.6	0.526

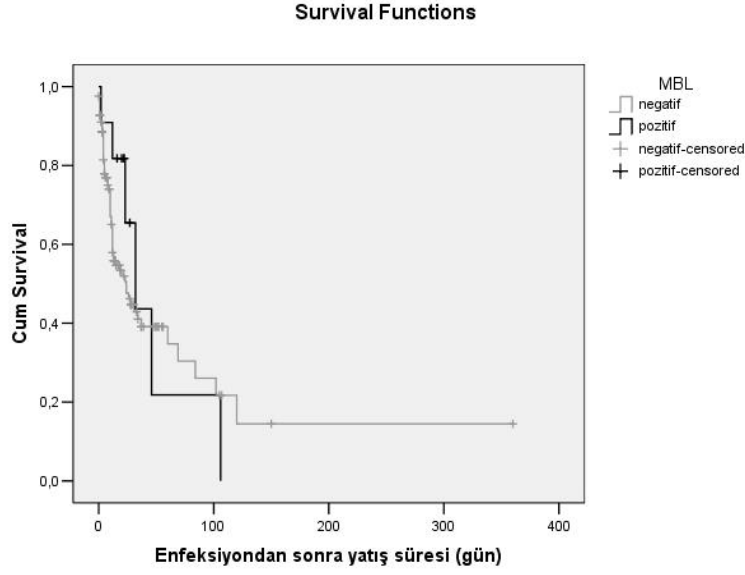
Tablo 25'in devamı

Enfeksiyondan önceki yatış süresi (gün); Ort± StD	33.1±32.3	22.9±21.1	0.394		
Enfeksiyondan sonraki yatış süresi (gün); Ort± StD	29.8±27.6	23.0±39.9	0.049		
Enfeksiyon özellikleri					
ASYE	2	3.2	60	96.8	*
ÜSE	3	15.8	16	84.2	*
Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu	4	16.0	21	80.4	*
Kan akımı enfeksiyonu	0	0	7	100.0	*
İntraabdominal enfeksiyon	1	20.0	4	80.0	*
Birden fazla bölge enfeksiyonu	1	10.0	9	90.0	*
Diğer bölge enfeksiyonları <sup>a</sup>	0	0	7	100.0	*
Polimikrobiyal enfeksiyon	3	4.5	64	95.5	0.218
Eşlik eden başka bir enfeksiyon	6	8.5	65	91.5	1.000
Enfeksiyonla ilişkili sepsis/septik şok	1	6.7	14	93.3	1.000
Altta yatan hastalık					
Herhangi bir veya daha fazla hastalık	7	6.5	101	93.5	0.230
Gebelik	0	0	2	1000	1.000
Dibetes Mellitus	2	12.5	14	87.5	0.620
Karaciğer hastalığı	1	14.3	6	85.7	0.456
Böbrek yetmezliği	3	11.1	24	88.9	0.460
Kardiyovasküler hastalıklar	3	8.6	32	8.6	1.000
Pulmoner hastalık	3	5.8	49	94.2	0.530
Nörolojik hastalık	1	2.1	47	97.9	0.096
Malignite	2	8.0	23	92.0	1.000
Son 30 günde hospitalizasyon	11	8.8	114	91.2	1.000
Son 30 günde cerrahi işlem	7	11.7	53	88.3	0.216
Son 30 günde travma	4	11.1	32	88.9	0.483
Son 30 günde immünoşüpresif tedavi	2	3.8	50	96.2	0.203
İnvaziv işlem uygulaması					
Herhangi bir invaziv işlem	8	7.5	98	92.5	0.702
Santral ven kateterizasyonu	5	11.1	40	88.9	0.505
Üriner kateterizasyon	7	6.9	94	93.1	0.468
Mekanik ventilasyon	5	5.9	80	94.1	0.328
Total parenteral nütrisyon	3	14.3	18	85.7	0.376
Hemodializ	3	20.0	12	80.0	0.106
Diğer invaziv işlemler <sup>b</sup>	3	14.3	18	85.7	0.376
Son 30 günde antibiyoterapi					
Herhangi bir antibiyotik kullanımı	9	7.4	113	92.6	0.286
Penisilinler	3	13.0	20	87.0	0.399
1 ya da 2. kuşak sefalosporinler	3	9.4	29	90.6	0.722
3. kuşak sefalosporinler	4	6.3	59	93.7	0.690
Karbapenemler	4	7.1	52	92.9	1.000
Aminoglikozidler	2	9.5	19	90.5	0.681
Kinolonlar	2	11.8	15	88.2	0.630
SXT	0	0	10	100	1.000

ASYE: Alt solunum yolu enfeksiyonları, ÜSE: Üriner sistem enfeksiyonları, SXT: Trimetoprim-sulfametaksazol, <sup>a</sup>: Kulak, konjonktiva, vagen; <sup>b</sup>: Ventriküloperitoneal şant, göğüs tüpü, nefrostomi, kolostomi, periton dializ kateteri; Ort: Ortalama, StD: Standart Deviasyon, \*: *p* değeri hesaplanamadı.

MBL pozitif olan grupta mortalite oranları; 2. günde %90.9±8.7, 12. günde %81.8±11.6, 23. günde %65.5±17.3, 32. günde %43.6±21.2 ve 46. günde %21.8±18.7 olarak hesaplanmıştır. MBL negatif grupta ise; 2. günde %91.0±2.6, 12. günde %57.9±4.8,

23. günde  $50.5 \pm 5.1$  olarak hesaplandı. İki grup arasında mortalite açısından anlamlı bir fark bulunamadı (Log Rank = 0.534,  $p = 1.000$ ) (Şekil 13).



**Şekil 13.** Erişkin yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitif *P. aeruginosa* varlığının mortaliteye etkisinin Kaplan Meier mortalite testi ile değerlendirilmesi



## 5. TARTIŞMA

Aerobik, gram negatif basil olan *P. aeruginosa*, yalnızca yaygın görülen enfeksiyon etkeni olması nedeniyle değil aynı zamanda enfeksiyonlarının yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olması nedeniyle klinik önem arz etmektedir (1). Tüm dünyada nazokomial enfeksiyonların %10-15'inden sorumlu tutulmaktadır. Sahip olduğu doğal direnç mekanizmalarının yanı sıra birden fazla antimikrobiyal grubuna karşı kazanılmış direnç geliştirebilmesi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır (3). Kazanılmış direnç mekanizmalarından biri olan MBL'lerin yayılımının hızlı olması, çeşitliliğinin her geçen gün artması ve türler arası yayılım gösterebilmesine karşın bu enzimlerin tanımlamasında kullanılabilecek yöntemlerin standardizasyonu henüz sağlanamamıştır. Ayrıca MBL üretiminin klinik etkisi, hastane enfeksiyon kontrol ve antimikrobiyal tedavi politikaları üzerine etkisi net olarak belirlenememiştir (16).

*Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları; en sık yoğun bakım servisleri olmak üzere, yanık üniteleri, kemoterapi ve radyoterapi üniteleri, organ transplantasyon üniteleri ve yoğun antibiyotik tedavisi uygulanan birimlerde görülmektedir (51). Belçika'da yapılmış bir çalışmada 40 farklı hastaneden toplanmış olan 716 *P. aeruginosa* izolatının %38'i yoğun bakım ünitelerinde, %21'i dahili servislerde, %12'si cerrahi servislerde ve %5.5'i hematoloji servisinde %23'ü diğer servislerde yatan hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (19). Tayvan'da yaygın ilaç direnci olan *P. aeruginosa* izolatlarının %37.8'i göğüs hastalıkları servisinde, %23.5'i cerrahi servislerde, %19.8'i acil ve poliklinik hastalarından izole edildiği belirlenmiştir (193).

Ülkemizde yapılmış bir çalışmada Onguru ve ark. (194) nazokomial enfeksiyon etkeni olan 75 imipenem dirençli *P. aeruginosa*'nın en sık yoğun bakım ünitelerinden daha sonra sırasıyla cerrahi ve dahili birimlerden izole edildiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza dahil edilen imipenem ya da meropeneme orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* izolatları, en sık (%51.8) yoğun bakım servislerinde, ikinci sıklıkta (%35.9)

çeşitli servislerde ve daha az sıklıkta (% 12.3) polikliniklerde takip edilen hastalardan izole edildi. Gerek yapılmış çalışmalarda gerekse bizim çalışmamızda görüldüğü gibi *P. aeruginosa* en sık yoğun bakım servislerinde takip edilen hastalardan izole edilmektedir.

*Pseudomonas aeruginosa* ülseratif keratit, otitis eksterna, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları başta olmak üzere toplum kökenli ve pnömoni, üriner sistem, kan akımı, cerrahi alan ve cilt enfeksiyonları gibi hastane kökenli enfeksiyonlarda önemli bir etkindir (1). Pitout ve ark. (160) 241 imipenem duyarlı olmayan *P. aeruginosa*'nın %43'ünü idrar, %21'ini yara, % 20'sini solunum yolu, %7'sini kan ve %9'unu ise diğer klinik örneklerden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Harris ve ark. (195) çalışmalarında imipeneme dirençli 120 *P. aeruginosa* izolatının %50'sini solunum yolu, %15'ini idrar, %11'ini yara, %7'sini kan örneklerinden izole etmişlerdir. Furtado ve ark. (196) ise 68 imipenem direçli *P. aeruginosa* izolatının %34.9'unu üriner sistem, %22.2'sini solunum yolları, %20.6'sını katater ucu, %12.7'sini kan, %4'ünü cerrahi yara, %4.8'ini diğer bölge örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Onguru ve ark. (194) hastane enfeksiyonu etkeni 75 imipenem dirençli izolatın %57'sinin cerrahi alan, %19'unun pnömoni, %15'inin üriner sistem, %9'unun kan akımı enfeksiyonu etkeni olduğunu bildirmişlerdir. Atilla ve ark. (197) 110 *P. aeruginosa* izolatının 40'nın idrar, 26'sının eksuda, 20'sinin kan, 24'ünün ise diğer klinik materyallerden (balgam, trakeal aspirat, doku biopsisi, beyin omurilik sıvısı, plevra sıvısı, konjonktiva) izole edildiğini rapor etmişlerdir. Yetkin ve ark. (184) ise 105 *P. aeruginosa* izolatının %35'ini idrar, %33'ünü alt solunum yolu örnekleri (trakeal aspirat, balgam, bronkoalveolar lavaj sıvısı), %15'ini kan, %8'ini yara sürüntü ve %9'unu diğer örneklerden (periton sıvısı, plevral sıvı, apse) izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda izolatlar sıklık sırasına göre solunum yolu (%49.4), genitoüriner sistem (%18.9), cilt ve yumuşak doku (% 17.6), kan (%8.4) ve diğer bölge (%19) örneklerinden izole edildi. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının, en sık solunum yolu, üriner sistem ve cilt ve yumuşak doku örneklerinden izole edildiği görülmüştür.

*Pseudomonas* enfeksiyonlarının antimikrobiyal tedavisinde piperasilin ve tikarsilin gibi antipsödomonal penisilinler, seftazidim ve sefoperazon gibi üçüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler ve de siprofloksasin gibi kinolonlar ilk seçenek

antibiyotiklerdir. Ne yazık ki artan direnç oranları nedeniyle bu ajanların kullanılabilirliği tehdit altındadır (6,7,72).

Kanada'da yapılmış bir çalışmada 2007-2009 yıllarında kan kültürlerinden izole edilmiş 332 *P. aeruginosa* izolatının direnç oranları piperasilin/tazobaktam için %5.4, seftazidim için %9.2, gentamisin için %15.3, siprofloksasin için %19.0 olarak bulunmuştur (198). 2005-2010 yıllarında Meksika'da yapılan bir çalışmada iki farklı hastaneden 404 *P. aeruginosa* izolatu tespit edilmiş ve bu izolatların %15.5'i piperasilin/tazobaktama, %24.0'ı seftazidime, %9.9'u sefepime, %31.9'u gentamisine, %23.7'si amikasine ve %20.0'ı siprofloksasine dirençli saptanmıştır (199). Hindistan'da yapılmış bir çalışmada ise 109 *P. aeruginosa* izolatının %90.8'inde piperasilin direnci, %63.3'ünde piperasilin/tazobaktam direnci, %65.1'inde amikasin direnci, %79.8'inde siprofloksasin direnci saptanmıştır (200). Pitout ve ark. (158) 2002-2006 yıllarını kapsayan çalışmada karbapenemlere dirençli 528 *P. aeruginosa* izolatının diğer ajanlara direnç oranlarının piperasilin için %9, seftazidim için %34, gentamisin için %62, siprofloksasin için %49 olduğunu bildirmişlerdir. Bahar ve ark. (201) ise 2009 yılında yanık ünitesinden izole edilmiş 115 imipenem dirençli izolatın %80'ini piperasiline, %100'ünü seftazidime, %100'ünü gentamisine, %81.7'sini amikasine %77.4'ünü siprofloksasine dirençli bulmuşlardır.

Ülkemize ait direnç oranlarına baktığımızda Aoga'in ve ark. (202) 2003-2006 yıllarında izole edilmiş 74 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının %39'unu piperasilin/tazobaktama, %36'sını sefepime, %19'unu ise amikasine dirençli bulmuşlardır. 2004-2010 yıllarını kapsayan ve altı yıllık direnç oranlarının kıyaslandığı başka bir çalışmada ise *P. aeruginosa* izolatlarının direnç oranlarının piperasilin tazobaktam için %21.8-%56.0, seftazidim için %61.5-%96.8, amikasin için %7.8-%60.3, siprofloksasin için %48.0-%65.5 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (203). Bayram ve ark. (48) 2009-2011 yılları arasında yanık hastalarından izole ettikleri 30 *P. aeruginosa* izolatının %31'ini piperasilin/tazobaktama, %32'sini seftazidime, %25'ini sefepime, %36'sını gentamisine, %21'ini amikasine, %25'ini siprofloksasine dirençli bulmuştur.

Bizim çalışmamızda ise izolatların %48.2'si piperasiline, %39.2'si piperasilin/tazobaktama, %46.7'si seftazidime, %47.5'i sefepime, %59.0'u aztreonama, %31.4'ü gentamisine, %15.3'ü amikasine ve %31.4'ü siprofloksasine dirençli bulundu.

*Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında sıklıkla karbapenemlerin kullanılması karbapenem direncinin yaygınlaşmasından sorumlu tutulmaktadır. Karbapenem direncine

neden olan mekanizmalardan biri olan MBL'ler geniş etki spektrumuna sahip olmaları ve integronlar aracılığıyla yayılabilmeleri nedeniyle klinik öneme sahiptir. MBL'lerin laboratuvar tanımlanması uygun tedavinin seçilebilmesi ve enfeksiyon kontrolünde algoritmaların oluşturulabilmesi için önemlidir. Fakat bu ezimleri üreten mikroorganizmaların tanımlanması direnç profilinin değerlendirilmesi gibi basit bir yöntemle mümkün olmadığı gibi henüz standardize bir yöntem mevcut değildir (3,47,74,110,204). MBL'lerin tespitinde ve tanımlanmasında PZR her ne kadar altın standart yöntem olsa da kullanımı araştırma amaçlı çalışmalar ile sınırlı kalmıştır. MBL'lerle ilgili genotipik bilgiye ihtiyaç olduğu gibi tanımlanmalarında fenotipik yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır (204). Çinko iyonuna ihtiyaç gösterdiği bilinen MBL'lerin araştırılmasında çeşitli metal şelatörlerle çinkonun bağlanması sonucu enzim aktivitesinin inhibe edilmesini temel alan yöntemler geliştirilmiştir (160,165,205-207). İmipenem, meropenem ve seftazidim gibi beta laktamlar ile birlikte EDTA ve 2-MPA gibi metal şelatörlerin kullanıldığı sinerji testlerinin yanı sıra uygulaması kolay bir yöntem olarak MHT karbapenemaz tayininin yanı sıra MBL tayininde kullanımı açısından incelenen yöntemlerdendir (162,163).

Hodge testini, Lee ve ark. (162) modifiye ederek MBL tespiti için kullanmışlardır. Bu çalışmada 530 *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Acinetobacter* spp. izolatını MHT ile MBL varlığı yönünden incelemiş ve 43'ünü pozitif bulmuşlardır. Çalışmada incelenmiş olan 493 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının 28'ini MHT pozitif, 24'ünü belirsiz ve 441'ini negatif; 9 *Pseudomonas putida* izolatının altısını pozitif, üçünü belirsiz ve 28 *Acinetobacter* spp. izolatının dokuzunu pozitif, dördünü belirsiz ve 15'ini negatif bulmuşlardır (162). Jesudason ve ark. (208) ise 50 karbapenem orta duyarlı/dirençli gram negatif nonfermantatif bakterinin karbapenemaz ve MBL üretimini MHT ile araştırmışlardır. MHT ile karbapenemaz ve MBL üretimi tespit ettikleri 28 izolatın 16'sı *P. aeruginosa* olduğu rapor edilmiştir (208). Yanık hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimi araştırılmış ve izolatların %16'sında MHT ile pozitif bulmuşlardır (209). İmipenem duyarlı ya da orta duyarlı çeşitli izolatlarda yapılmış bir çalışmada ise 138 *P. aeruginosa* izolatının 42'sinde MHT pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından MHT, karbapenem duyarlı ya da orta duyarlı izolatlarda karbapenemaz üretiminin değerlendirilmesinde önerilmiştir (210). 179 karbapenem

dirençli izolatta yapılmış başka bir çalışmada ise MHT izolatların 169'unda (%94.4) pozitif bulunmuştur (211).

Ülkemizde *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz ve MBL varlığının araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur (212-214). Çakar ve ark. (212) MHT ile 110 izolatın altısında (%5.5) MBL pozitif, 104'ünde (%94.5) ise negatif bulmuştur. Tetik ve ark. (213) ise imipenem dirençli 52 *P. aeruginosa* izolatından 30'unda (%58) MHT pozitifliği saptamıştır. Saraç ve ark. (214) hastane enfeksiyonu etkeni olan karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli 29 izolatta MBL üretimini araştırmışlardır. MBL üretimini açısından izolatların altısını (%20.7) pozitif; 23'ünü (%79.3) ise MHT ile negatif bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda bu sonuçlarla uyumlu olarak, izolatların % 6.3'ünde MHT pozitif ve %47.6'sında negatif saptanırken, %46.1'inde değerlendirilememiştir. *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimini değerlendirmek amacıyla yapılmış olan çeşitli çalışmalarda MHT ile %5.5 ila %94.4 arasında tespit edildiği görülmektedir (162,208-214).

İmipenem/imipenem+EDTA kombine disk testi, MBL tespitinde kullanılan beta laktam ajanlar ile metal şelatörlerin sinerjistik etkisinin gözlemlenmesine dayalı fenotipik testlerden biridir (133,215). Scheffer ve ark. (216) kombine disk yöntemiyle 29 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının yedisinde MBL pozitifliği saptamıştır. Nazokomiyal üriner sistem enfeksiyonu etkenlerinde MBL varlığının incelendiği bir çalışmada 81 *P. aeruginosa*, dört *Pseudomonas putida*, iki *Burkholderia cepacia* izolatından 31'i imipenem dirençli bulunmuştur. İmipenem dirençli izolatların %16'sında KDT ile MBL üretimi saptanmıştır (217). 2012 yılında yapılmış bir çalışmada ise imipenem dirençli 63 *P. aeruginosa*'nın 44'ünde (%69.8) ve 46 *Acinetobacter* spp.'nin 19'unda (%41.3) KDT yöntemiyle MBL saptanmıştır (200). 179 karbapenem dirençli izolatta yapılmış başka bir çalışmada ise KDT izolatların %80.4'ünde (144 izolat) pozitif bulunmuştur (211).

Türkiye'de yapılmış çalışmalarda ise Çakar ve ark. (212) 110 *P. aeruginosa* izolatının 32'sinde (%29.1), Tetik ve ark. (213) ise 52 *P. aeruginosa*'nın 32'sinde (% 61.5) MBL saptamışlardır. Altoparlak ve ark. (218) yanık ünitesindeki hastalardan izole edilmiş olan karbapenemlere dirençli 40 *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatından 22'sinde (% 55) pozitiflik saptamışlardır.

Çalışmamızda ise izolatların %32.6'sında kombine disk testiyle pozitiflik saptanmıştır. Yapılmış çalışmalarda pozitiflik oranlarının %16 ila %80.4 arasında değiştiği görülmüş ve çalışmamızın sonuçları bu oranlar ile uyumlu bulunmuştur (210-213,216-218).

Metallo beta laktamaz tayini için çok sayıda araştırmacı tarafından çeşitli fenotipik testler denenmiş olmasına karşın özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir yöntem belirlenememiş ve standardize edilememiştir. Bu durum araştırmacıları MBL tayininde; PZR, izoelektrik fokuslama, poliakrilamid jel elektroforezi ve nükleotid sekans analizi gibi özgüllüğü ve duyarlılığı çok daha yüksek ancak yoğun emek ve uzmanlık gerektiren moleküler yöntemlerin kullanılmasına yöneltmiştir (9,11).

Tayvan'da 2001 yılında 209 *P.aeruginosa* izolatının 21'inde PZR analizi ile MBL saptamışlar. 21 izolatın 16'sının *bla*<sub>VIM-2</sub>, beşinin ise *bla*<sub>IMP-1</sub> olduğunu bildirilmiştir (120). Pitout ve ark. (161) imipenem duyarlı olmayan 241 *P. aeruginosa* izolatının 107'sinde (%44,39) PZR ile MBL saptanmış; bunların 103'ünün (%43) *bla*<sub>VIM</sub> ve dördünün (%2) ise *bla*<sub>IMP</sub> olduğunu rapor etmişlerdir. Samuelsen ve ark. (219) 138 imipenem ve/veya meropenem dirençli izolatın birinde *bla*<sub>VIM-2</sub> ve birinde ise *bla*<sub>VIM-4</sub> olmak üzere iki izolatta MBL saptanmıştır. Qu ve ark. (220) imipenem duyarlı olmayan 264 *P. aeruginosa*'nın 10'ünde *bla*<sub>VIM-2</sub>, 13'ünde *bla*<sub>IMP-9</sub> ve birinde *bla*<sub>IMP-1</sub> olmak üzere toplam 24 izolatta PZR ile MBL tespit etmişlerdir. Scheffer ve ark. (216) karbapenem dirençli 29 izolatın altısında *bla*<sub>SIM-1</sub> ve birinde *bla*<sub>IMP-16</sub> olmak üzere 17 izolatta PZR ile MBL saptamışlardır. Bahar ve ark. (192) imipenem dirençli 115 *P. aeruginosa* izolatından 23'ünde *bla*<sub>VIM</sub> geni saptanmışlardır. Khosravi ve ark. (204) tarafından 90 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatından 32'sinde PZR ile MBL tespit edilmiştir. Bunların 17'sinin *bla*<sub>VIM-2</sub>, 12'sinin *bla*<sub>IMP-7</sub>, ikisinin *bla*<sub>IMP-4</sub> ve birinin ise *bla*<sub>VIM-11</sub> olduğu rapor edilmiştir (204).

Ülkemizde ilk tespit edilen MBL, 2004 yılında Bahar ve ark. (14) tarafından *P. aeruginosa* izolatında saptanan VIM-5'dir. VIM-5 daha sonraki yıllarda *Enterobacter cloacae* ve *Pseudomonas putida* izolatlarında da saptanmıştır (140,221). VIM-2 ise ülkemizde 2007'de Yakupoğulları ve ark. (142) tarafından aynı zamanda PER-1 eksprese eden bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. 2006 yılında ise aynı zamanda CTX-M-15 tipi GSBL de saptanmış olan *K. pneumonia* izolatında ilk IMP-1 saptanmıştır (141).

Çakar ve ark. (212) 2005 yılında yaptıkları çalışmada 110 izolatın 11'inde PZR ile *bla<sub>VIM</sub>* geni saptamışlardır. Çelik ve ark. (222) 2007 yılında 50 hastadan izole edilmiş olan çoğul dirençli *P. aeruginosa* izolatının hiç birinde PZR ile MBL saptamamışlardır. Kavruk ve ark. (223) 2007 yılında hastane enfeksiyonu olan 123 *Pseudomonas* izolatının PZR ile yedisinde (%5.7) IMP grubu MBL gen varlığını göstermişlerdir. 2009 yılında Bozçal ve ark. (224) imipeneme dirençli/orta duyarlı olan 38 *P. aeruginosa*'nın yedisinde *bla<sub>VIM</sub>* ve birinde *bla<sub>IMP</sub>* genine uygun PZR ürünü saptamışlardır. Kaya ve ark. (214) 2011 yılında nazokomiyal enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen ve karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatından PZR ile 11'inde (%37.9) VIM-1 geni ile uygun büyüklükte PZR ürünü saptarken IMP-1, VIM-2 ve IMP-2 genleri uygun PZR ürünü saptamamışlardır (214).

Hastanemizde 2007 yılında Özgümüş ve ark. (15) tarafından yapılmış olan bir çalışmada ise PZR metoduyla 100 *Pseudomonas* izolatından birinde (%1) VIM, dokuzunda (%9) IMP olmak üzere toplam 10 (%10) izolatta MBL saptanmıştır. Bizim çalışmamızda karbapenemlere dirençli 334 *P. aeruginosa* izolatının 20'sinde (%6.0) sadece VIM, dokuzunda (%2.7) sadece IMP ve üçünde (%0.9) hem VIM hem de IMP olmak üzere toplam 32 izolatta (%9.6) MBL saptanmıştır. İzolatların hiç birinde GIM, SIM, SPM tipi MBL'ler saptanmamıştır.

Bahsi geçen uluslararası çalışmalarda ülkeler arasında farklılıklar izlenmekle birlikte %1.4 gibi oldukça düşük oranlardan ve %65.2 gibi yüksek oranlara kadar değişebilen sıklıkta MBL pozitifliği izlenebileceği görülmüştür (120,161,204,216,219,220). Ulusal çalışmalar göre ise MBL bazı bölgelerde hiç saptanmamışken bazı bölgelerde %37.9 gibi çok yüksek oranlara kadar çıkabildiği görülmüştür (15,212,214,222-224). Çalışmamızın sonuçları bu oranlar ile uyumlu bulunmakla birlikte hastanemizdeki MBL sıklığının önceki yıllara nazaran artış göstermediği gözlemlenmiştir (15).

VIM-1 tipi MBL taşıyan ilk izolatlar Fransa (1995), İtalya (1997) ve Yunanistan (1998) gibi güneydoğu Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir ve daha sonraki yıllarda Polonya, Portekiz, İspanya, İsviçre, Macaristan, Hırvatistan ve Almanya gibi diğer Avrupa ülkelerinde de yaygınlaştığı görülmüştür (81,95). Bu dönemlerde VIM tipi MBL'lerin Avrupa ülkelerine özgül olduğu düşünülmüştür. Ancak sonraki yıllarda VIM tipi MBL'lerin sadece Avrupa'da değil aynı zamanda Kore'de ve diğer ülkelerde

endemisitenin görülebildiği ayrıca Güney ve Kuzey Amerika, son zamanlarda ise Avusturalya, Hindistan ve İran'da görüldüğü bildirilmiştir (13,225-231). Beş kıtadan toplam 37 ülkede çeşitli çalışmalarda rapor edildiği gibi VIM-2 tüm dünyada türler arasında en baskın tip olduğu görülmüştür (13,232). IMP tipi MBL'ler ise Japonya ve birkaç Güneydoğu Asya ülkesinde sınırlıyken günümüzde Çin de dahil olmak üzere Güneydoğu Asya, Avusturalya, ABD, Kanada, Brezilya ve İngiltere'den de bildirilmektedir (9,13).

Ülkenizde yapılmış çalışmaların üçünde VIM; diğer ikisinde IMP tipi MBL daha yüksek oranda bildirilmiştir (15,212,214,221-224). Özgümüş ve ark. (15) hastanemizde IMP tipi MBL'yi daha yüksek oranda saptamış olmalarına karşın bizim çalışmamızda ise VIM, IMP'ye göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hastanemizde MBL sıklığında artış gözlenmemesine karşın baskın olan MBL tipinin VIM lehine değiştiğini göstermiştir. Çalışmamızda 2008 yılında MBL saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının hepsi (13 izolat) VIM; 2009 yılında saptananların dördü sadece VIM, üçü sadece IMP, üçü hem VIM hem de IMP ve 2010 yılında tespit edilenlerin ise üçü VIM, üçü IMP tipi MBL taşımaktaydı. Bu üç yıl içinde MBL sıklığında azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca 2008 yılında tespit edilen MBL'lerin hepsinin VIM olması hastane içi salgın ihtimali konusuna dikkat çekici olmuştur.

Lee ve ark. (225) tarafından beş *Acinetobacter* genomospecies 10 klinik izolatının aynı anda iki farklı MBL tipinin taşıdığı saptanmıştır. Bu izolatlardan üçünün aynı anda VIM-2 ve IMP-1, birinin VIM-2 ve SIM-1 ve birinin ise IMP-1 ve SIM-1 taşıdığı rapor edilmiştir (225). Hindistan'da yapılmış bir çalışmada da *A. baumannii* izolatının aynı anda VIM ve IMP taşıdığı bildirilmiştir (211). Brezilya'da yapılmış bir çalışmada ise üç *P. aeruginosa* izolatında IMP-1 ve CTX-M2 ve bir izolatta ise IMP-1 ve GES-1'in birlikte eksprese edildiği rapor edilmiştir (233). Meksika'da yapılmış başka bir çalışmada ise üç *P. aeruginosa* izolatından ikisinde SPM-1'in yanı sıra VIM-2'nin ve birinde de IMP-15'in eksprese edildiği gösterilmiştir (234). Ülkemizde de bir *P. aeruginosa* izolatının VIM-2 ve PER-1'i birlikte eksprese ettiği bildirilmiştir (221). Bizim çalışmamızda üç izolatta VIM ve IMP birlikte saptanmıştır. Bu bilgiler MBL'lerin hareketli genetik elemanlar aracılığıyla hızla yayıldığını desteklemektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir ve yüksek özgüllükte primerlerle çalışılması gerekmektedir (9). Bu çalışmada VIM ve IMP



genlerinin her birine özgül farklı ikişer primer çifti kullanılmıştır. VIM genine özgül primerlerden PZR ürünlerinden biri 382 bp diğeri ise 261 bp büyüklüğündedir. 261 bp ürün büyüklüğüne sahip olan primer çifti ile izolatların yalnızca altısında VIM genine özgül PZR ürünü saptandı. 382 bp ürüne sahip olan primer çiftiyle; VIM saptanan altı izolat da dahil olmak üzere toplam 23 izolatta VIM tespit edildi. IMP geninin araştırılmasında kullanılan primer çiftlerinin ürünleri ise 188 bp ve 765 bp büyüklüğündedir. 765 bp ürün büyüklüğüne sahip primer ile 3 izolatta IMP geni saptanırken 188 bp ürün büyüklüğüne sahip primer çifti ile IMP saptanan üç izolat da dahil olmak kaydıyla toplam 12 izolatta IMP tipi MBL gen tespit edildi. Bu sonuçlar PZR için kullanılmış olan farklı primer çiftlerinin farklı özgüllüklerde olduğunu düşündürmüştür. PZR için dizayn edilmiş olan primer çifti test sonucunun özgüllüğünü de etkilediği bilinmektedir (235,236).

Metallo beta laktamazların *Pseudomonas* spp. *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae* üyeleri gibi klinik olarak önemli patojenlerde yaygınlaşması, integron ve plazmit gibi hareketli genetik elemanlar ile taşınıyor olması ve MBL bulunan mikroorganizmalar ile enfekte hastalarda mortalitede artış izlenmesi büyük bir endişe kaynağı olmuştur. Yayılımının önlenmesi ve erken tanı için standardize bir fenotipik teste ihtiyaç olduğunu göstermiştir (96).

Modifiye Hodge testi ilk kez 2001 *Pseudomonas* ssp. ve *Acinetobacter* spp. izolatlarında MBL tayininde kullanan Lee ve ark. (162) yaptıkları çalışmada imipenem hidroliz deneyi ile kıyasladıklarında testin duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü ise %88 olarak bulmuşlardır. Ancak bu araştırmacıların 2003'de yaptıkları başka bir çalışma sonucunda; seftazidim dirençli ama imipenem duyarlı *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. izolatlarında besiyerine çinko ekleyerek yaptıkları MHT sonuçlarını PZR ile kıyasladıklarında MHT'in duyarlılığının %83.7 ve özgüllüğünün %97.4 olduğunu bildirmişlerdir (163). Franco ve ark. (237) ise imipenem dirençli izolatlarda MHT'nin duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla SPM-1 için %82.4 ve %75, VIM-2 için %90.4 ve %75.4 olduğunu bildirmişlerdir. Pasteran ve ark. (238) ise 36 karbapenemaz üreten, 38 MBL üreten ve 75 karbanemaz üreten *P. aeruginosa* izolatında yaptıkları çalışmada MHT'nin duyarlılığını %78, özgüllüğünü %57 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Pasteran ve ark. (239) başka bir çalışmada MHT'inde indikatör olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 yerine *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 kullanmışlardır. Bu çalışma neticesinde değerlendirilemeyen test sonuçlarının ekarte edilmiş olacağını ve bu şekilde yapılan

MHT'nin *P. aeruginosa*'da karbapenemaz ve MBL tespitinde %100 duyarlılık ve %98 özgüllük sağladığını bildirmişlerdir. Ancak bu yöntemin kullanılmasıyla *P. aeruginosa*'da karbapenemaz ya da MBL varlığının araştırıldığı ve bu bilgiyi destekleyen bir başka çalışma henüz mevcut değildir (Tablo 26).

Bizim çalışmamızda ise PZR ile kıyaslandığında MHT'nin duyarlılığı %40.0, özgüllüğü %86.2, pozitif prediktif değeri %28.6 ve negatif prediktif değeri %5.7 olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda MHT'in uygulaması kolay ve ucuz bir test olmasına karşın MBL tespitinde kullanımının tartışmalı olduğu görülmüştür (Tablo 26).

**Tablo 26. Pseudomonaslarda MBL ve karbapenemaz tespiti açısından Modifiye Hodge testinin değerlendirilmesi**

Araştırma	Çalışma grubu	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Lee ve ark. 2001 (162)	<i>Pseudomonas</i> spp ve <i>Acinetobacter</i> spp	%100*	%88*	-	-
Lee ve ark. 2003 (163)	Seftazidim dirençli ama imipenem duyarlı <i>P. aeruginosa</i> ve <i>Acinetobacter</i> spp.	%83.7	%97.4	-	-
Franco ve ark. 2010 (237)	İmipenem dirençli <i>P. aeruginosa</i>	%82.4 <sup>a</sup> %75 <sup>b</sup>	%90.4 <sup>a</sup> %75.4 <sup>b</sup>	%73.7 <sup>a</sup> %15.8 <sup>b</sup>	%94 <sup>a</sup> %98 <sup>b</sup>
Pasteran ve ark. 2011 (238)	36 karbapenemaz üreten, 38 MBL üreten ve 75 karbanemaz üretmeyen <i>P. aeruginosa</i>	%78	%57	-	-
Pasteran ve ark. 2011 (239)	Karbapenemaz ve MBL üreten <i>P. aeruginosa</i>	%100 <sup>c</sup>	%98 <sup>c</sup>	-	-
Bu çalışma	Karbapenem dirençli <i>P. aeruginosa</i>	%40.0	%86.2	%28.6	%5.7

\*: Altın standart yöntem olarak imipenem hidroliz deneyi kabul edilmiştir, <sup>a</sup>: SPM-1 pozitif izolatlar için, <sup>b</sup>: VIM-2 pozitif izolatlar için.

İmipenem/imipenem-EDTA kombine disk testi, 2002 yılında Yong ve ark. (164) tarafından geliştirilmiştir. İmipenem diskinde 750 µg EDTA ekledikleri çalışmada disklerin arasındaki inhibisyon zon çapı farkı 7 mm ve üzerinde ise pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada KDT'nin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak rapor edilmiştir (164). Yan ve ark.'nın (165) 2004 yılında MBL ürettiği bilinen *Pseudomonas* spp. ve *A. baumannii* izolatları ile benzer yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada testin duyarlılığını %87.0 ve özgüllüğünü ise %96.7 olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde 2003 yılında yapılmış olan Oh ve ark.'nın (240) çalışmasında imipenem/imipenem+EDTA kombine disk testinin VIM-2 pozitif izolatlarda duyarlılığı %93.9, özgüllüğü %99.0, pozitif prediktif değeri %96.9 ve negatif prediktif değeri %98.0 olarak saptanmıştır. IMP-1 pozitif izolatlarda duyarlılığı %0, özgüllüğü %99.0, pozitif prediktif değeri %96.9 ve

negatif prediktif değeri %98.0 olarak bulunmuştur. MBL için genel olarak ise duyarlılığı %88.6, özgüllüğü %98.9, pozitif prediktif değeri %96.9 ve negatif prediktif değeri %95.9 olarak bulmuşlardır (240). 2005 yılında Pitout ve ark. (161) kombine disk testini imipenem ve meropenem diskleri kullanarak yapmışlardır. Çalışma imipenem ve meropenem disklerine 744 µg, 930 µg ve 1302 µg olmak üzere üç farklı konsantrasyonda EDTA eklenerek gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 930 µg EDTA kullanılan testlerde inhibisyon zonunun değerlendirilmesinin daha net olduğunu belirtilmiştir ve testin duyarlılığını %96 ve özgüllüğünü %91 olarak bulmuşlardır (161).

**Tablo 27. Psödomonaslarda MBL ve karbapenemaz tesipiti açısından imipenem/imipenem+EDTA kombine disk testinin değerlendirilmesi**

Araştırma	Çalışma kriterleri	Duyarlılık	Ögüllük	PPD	NPD
Yong ve ark. 2002 (164)	750 µg EDTA ≥7 mm	%95.7	%91.0	-	-
Oh ve ark. 2003 (240)	730 µg EDTA ≥7 mm	%93.9 <sup>a</sup> 0 <sup>b</sup>	%99.0 <sup>a</sup> %99.0 <sup>b</sup>	%96.9 <sup>a</sup> %96.9 <sup>b</sup>	%98.0 <sup>a</sup> %98.0 <sup>b</sup>
Yan ve ark. 2004 (165)	750 µg EDTA ≥7 mm	%87.0	%96.7	-	-
Pitout ve ark. 2005 (161)	930 µg EDTA ≥7 mm				
Berges ve ark. 2007 (241)	750 µg EDTA ≥6 mm	%100	%72.7	%76.9	%100
Samuelsen ve ark. 2008 (219)	518 µg EDTA ≥8 mm	%100	%91	%29	%100
Manoharan ve ark. 2010 (242)	930 µg EDTA ≥7 mm	%90.9	%93.3	-	-
Franco ve ark. 2010 (237)	730 µg EDTA ≥8 mm	%100 <sup>c</sup> %100 <sup>a</sup>	%32.7 <sup>c</sup> %26.2 <sup>a</sup>	%32.7 <sup>c</sup> %7.7 <sup>a</sup>	%100 <sup>c</sup> %100 <sup>a</sup>
Bij ve ark. 2011 (243)	370 µg EDTA ≥5 mm	%100	%90	-	-
Yong ve ark. 2012 (244)*	518 µg EDTA ≥8 mm	%100	%11.4	-	-
Bu çalışma	930 µg EDTA ≥7 mm	%90.6	%73.5	%26.6	%98.7

\*: Müller Hilton agar yerine MacConkey agar kullanılmıştır, <sup>a</sup>: VIM-2 pozitif izolatlar için, <sup>b</sup>: IMP-1 pozitif izolatlar için, <sup>c</sup>: SPM-1 pozitif izolatlar için.

Kombine disk testininin MBL tayininde MHT'ne göre daha yüksek duyarlılıkta bulunmuş olmasının yanı sıra IMP tipi MBL tayininde seftazidim ve 2-MPA'nın; VIM tipi MBL üreten izolatların fenotipik olarak tayininde ise imipenem ve EDTA'nın duyarlılığının yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (219,241,243,244). Bazı çalışmalarda MBL tipine göre de duyarlılık ve özgüllüğünün değişebildiği görülmüştür (237,240). Tablo 23'de görüldüğü gibi bu konuda çok sayıda çalışma yapılmış olup gerek test koşulları gerekse değerlendirme kriteri ile ilgili araştırmacılar tarafından fikir birliği oluşturulamamış ve standardizasyon sağlanamamıştır (219,237,240-245).

Kombine disk testinde, EDTA'nın bakteriyel inhibisyon etkisinin olması inhibisyon zonunun MBL'nin EDTA ile inhibe olması sonrasında mı yoksa EDTA'nın kendisinin

bakteriyel inhibisyon yapmasından mı kaynaklandığının ayrımı yapılamayacağından pozitif değerlendirilmesi söz konusu olabilmektedir (246). *P. aeruginosa*'da EDTA'nın hücre geçirgenliğinde azalma ve OprD ekspresyonunda azalma etkisi sonucu testte yalancı pozitiflikler olabilmektedir (9,241).

Modifiye Hodge test ve KDT gibi fenotipik testlerin MBL tayininde yetersiz kaldığı görülmüştür. Ayrıca günümüzde bilinen MBL türleri dışında MBL olabileceği ve fenotipik testlerde pozitifliklerin bilinen MBL türleri dışında henüz bilinmeyen MBL'lerden kaynaklanabileceği de ihtimal dahilinde bulundurulmalıdır.

VIM ve IMP tipi enzimler pek çok ülkede en yaygın olarak bildirilen MBL tipleridir. Çeşitli ülkelerde MBL türlerinin yayılımının yanı sıra MBL üreten izolatların yaptığı salgınlar da bildirilmektedir. Her ne kadar çeşitli ulusal çalışmalarda lokal yayılımın incelendiği görülse de kıtalar arası yayılımın araştırıldığı global epidemiyolojik çalışmalar kısıtlı sayıdadır (247).

Patzer ve ark. (248) Polonya'da 1998-2001 yılları arasında hospitalize çocuk hastaların klinik örneklerinden topladıkları imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının MBL üretimini ve PFGE ile klonal ilişkilerini incelemişlerdir. Bu izolatların 11 tanesinde PZR ile *bla<sub>VIM-4</sub>* geni saptamışlardır. PFGE ile bu izolatların 4 farklı patern gösterdiğini ve 3 altgrupta toplandığını bildirmişlerdir (248). 1998-2004 yılları arasında yine Patzer ve ark. (249) Polonya'da bir çocuk hastanesinde dokuz yıllık sürede 20 *Pseudomonas* izolatında MBL tespit etmişlerdir. Bunlardan iki *P. aeruginosa* izolatının VIM-2, 16 *P. aeruginosa* izolatının VIM-4 ve iki *Pseudomonas putida* izolatının VIM-4 taşıdığını göstermişlerdir. VIM-4 saptanmış *P. aeruginosa* izolatları PFGE ile genetik olarak ilişkili bulunmuştur. Araştırmacılar MBL içeren izolatların yıllarca hastanede kalabileceğini ve eradikasyonun güç olduğunu vurgulamışlardır (249).

Pitout ve ark. (158) 2002-2006 yılları arasında üçü erişkin biri pediatrik olmak üzere dört farklı hastaneden toplanmış 518 tanesi hasta örneklerinden 10 tanesi çevre örneklerinden izole edilmiş 528 karpanem dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL üretimini ve klonal ilişki varlığını araştırmışlardır. 178 izolatta VIM-2, yedi izolatta ise IMP-7 saptamışlardır. 178 VIM pozitif izolat iki yakın ilişkili patern göstermiştir ve bunların 154'ü bir grup oluştururken 21'i farklı bir grup oluşturmuştur. Üç VIM pozitif izolatın ise bu paternler ile ilişkisiz olduğunu tespit etmişlerdir. IMP pozitif izolatların ise bu gruplardan farklı bir grupta olduğunu bildirmişlerdir (158).

2009-2010 yıllarında Japonya'nın farklı bölgelerinde 114 hastaneden toplanan 217 çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'ların 145'inde IMP saptanmıştır. İzolatların 128'i PFGE ile genetik ilişkili olup bir grupta tolanırken 16'sının genetik ilişkili bir başka grup oluşturduğunu saptamışlardır. İzolatların farklı coğrafik bölgelerden izole edilmesine karşın genetik ilişkili olması dikkat çekici olmuştur (250).

Güney Kore'de yapılmış bir çalışmada ülke genelinden 664 *P. aeruginosa* izolatu toplanmış ve izolatların 224'ünde karbapenem direnci saptanmıştır. Karbapenem dirençli izolatların 35'inde IMP-6 tespit edilmiştir. IMP saptanan 35 izolatın hepsi PFGE ile %85 ve üzerinde klonal ilişkili bulunmuştur. Ülke genelinde tek bir izolatın yayılım göstermiş olduğu görülmüştür (251).

Hastanemizde yapılmış olan Özgümüş ve ark.'nın çalışmasında IMP saptanmış dokuz *P. aeruginosa* izolatu repetitif intergenik konsensus PZR (ERIC-PCR) yöntemi ile klonal ilişkili bulunmuş olup hastanemizde IMP üreten *P. aeruginosa* izolatlarının yayılımı olduğu gösterilmiştir (15).

Çalışmamızda pediatrik yaş grubu yatan hastaların VIM tipi MBL tespit edilen izolatlarından PFGE ile üçü (PA14, PA19, PA206) %90 ve üzeri oranda klonal ilişkili bulundu. Bu izolatların üçü de Pediatri Süt Çocuğu Servisinde yatan hastalardan 2009 yılı Şubat-Ağustos aylarında izole edildi. Her üç izolatın antibiyotik duyarlılık sonuçlarının benzer olduğu görüldü. Bu izolatların hepsinde KDT ile de MBL üretimi izlenebildi. MHT ise PA14'de pozitif iken PA19 ve PA206'da değerlendirilemedi.

Çalışmamızda pediatrik yaş grubu yatan hastaların IMP saptanan *P. aeruginosa* izolatlarından ise ikisi (PA31, PA35) arasında %83 oranında benzerlik tespit edildi. PA31 ve PA35 izolatları 2010 yılı Mart ayında Pediatri YBS'de yatan iki hastadan izole edildi ve her iki izolatın antibiyotik duyarlılık paternleri benzer bulundu. Her iki izolatta MHT ve KDT ile fenotipik olarak MBL üretimi görüldü. Aynı dönemde aynı serviste yatmış başka bir hastaya ait olan PA33 izolatu ise antibiyotik duyarlılık paterni bakımından benzer olmasına karşın PFGE profiline göre diğer iki izolatla %52 ilişkili saptandı. VIM ve IMP birlikte pozitif saptanan PA146 izolatu ise IMP pozitif saptanan PA140 izolatu ile %80 ilişkili bulundu. Bu izolatlar 2009 yılının Şubat-Mart aylarında iki farklı serviste yatan hastalardan izole edildi. PA146 izolatında MHT değerlendirilemedi ve KDT ile fenotipik olarak MBL üretimi izlendi. PA140 izolatında ise MHT negatif bulunurken KDT pozitif bulundu. İki izolatın antibiyotik duyarlılık paternlerinde farklılıklar olduğu görüldü.

Çalışmamızda erişkin yaş grubu yatan hastalardan izole edilen VIM tipi MBL üreten 13 izolatın 11'inde (PA230, PA237, PA259, PA282, PA238, PA298, PA254, PA43, PA238, PA241, PA236) %90 ve üzerinde klonal ilişki saptanırken ikisi (PA272, PA306) hem diğer izolatlarla hem de birbirleriyle büyük oranda farklı bulunmuştur. Aralarında yakın klonal ilişki saptananan 11 VIM pozitif izolatın dördü Anestezi ve Cerrahi Yoğun Bakım Servisinde, ikisi Nöroloji ve Nöroşirurji Yoğun bakım Servisinde ve diğerleri ise Yanık Ünitesi, Dahiliye Servisi, Kardiyoloji Servisi, Plastik Cerrahi Servisi, Ortopedi Servisi gibi hastanemizin farklı kliniklerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Ayrıca bu izolatlar 2008-2010 yıllarında farklı zamanlarda izole edilmiştir. Klonal ilişkili bulunan izolatlarda PA238 dışında hepsinde KDT ile fenotipik olarak MBL üretimi gösterilmişken MHT ile gösterilemedi ve izolatların antibiyotik duyarlılıklarında farklılıklar mevcuttu. Klonal ilişki saptanamayan iki izolat ise Cerrahi Yoğun Bakım servisinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Erişkin yaş grubu yatan hastalardan izole edilen IMP tipi MBL üreten 4 *P. aeruginosa* izolatından üç izolat (PA136, PA139, PA145) arasında %92 ve bu izolatların diğer bir izolat (PA166) ile aralarında %78 benzerlik saptandı. Bu izolatlar Plastik Cerrahi Servisi, Nöroloji Yoğun Bakım Servisi, Dahiliye Yoğun Bakım Servisi ve Genel Cerrahi servislerinde takip edilen hastalardan 2009 yılı içinde farklı tarihlerde izole edildi. İzolatların hepsinde KDT ile MBL üretimi gösterilmişken MHT ile pozitif sonuç elde edilmedi ve antibiyotik duyarlılıkları farklılıklar göstermekteydi.

Çalışmamızda erişkin yaş grubu poliklinik hastalarında ise VIM tipi MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarından iki tanesi (PA152 ve PA277) birbiri ile %88 ilişkili ve aynı anda VIM ve IMP bulunduran PA156 ise bunlarla %78 ilişkili bulunmuştur. İzolatların biri (PA152) Üroloji Polikliniğinde, diğer ikisi (PA277 ve PA156) ise Kulak Burun Boğaz Polikliniğinde Haziran 2008- Nisan 2009 tarihleri arasında tetkik ve tedavi uygulanmış hastalardan izole edildi. İzolatların üçünde de KDT ile MBL üretimi fenotipik olarak da gösterilmiş olup MHT ile pozitiflik elde edilmedi ve antibiyotik duyarlılık paterninde farklılıklar gözlemlendi. Erişkin yaş grubu poliklinik hastalarının IMP ve VIM birlikte pozitif bulunan PA143 ile PA156 izolatları birbiri ile %75 benzer bulundu. İzolatların her ikisi 2009 yılı Nisan ve Mayıs aylarında Kulak Burun Boğaz Polikliniği ve Acil Poliklinikte tetkik ve tedavi uygulanmış hastalardan izole edildi. PA143 izolatında da kombine disk testi ile fenotipik olarak MBL gösterildi.

Çalışmamızda yapılan PFGE sonuçlarına göre VIM pozitif izolatların ve IMP pozitif izolatların kendi aralarında klonal ilişki gösterdikleri ve klonal ilişkili saptanan izolatların gerek antibiyotik duyarlılık paterni açısından gerekse MBL'lerin fenotipik olarak üretilebilmesi açısından farklılıklar sergileyebildiği gözlemlendi. Genetik ve epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan izolatlar da aynı plazmidi bulundurabileceklerinden benzer duyarlılık paterni sergileyebilmektedir. Bu nedenle antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının epidemiyolojik çalışmalarda değeri düşüktür (252,253).

Genetik ilişkili IMP pozitif *P. aeruginosa* izolatların hastanemizde 2002-2004 yıllarında yayılımı ile ilgili veri mevcut olup benzer şekilde çalışmamızda 2008-2010 yıllarında pediatrik yaş yatan hastalar, erişkin yaş yatan hastalar ve hatta poliklinik hastalarında MBL pozitif izolatlara ait genetik ilişkili klonlar belirlenmiştir (15). MBL pozitif izolatın hem hastane içinde farklı servislerde hem de toplumda yayılabildiği gözlemlenmiştir Ülkemizde de dünyada olduğu gibi *P. aeruginosa*'nın neden olduğu salgınlar rapor edilmektedir. Salgınlardan sıklıkla enfekte hastayla ve kontamine materyallerle doğrudan temas edilmesi, medikal malzemelerin yetersiz dezenfeksiyonu, yanlış eldiven kullanımı, hastane çalışanlarının elle teması sonucu betadin şişesi, sıvı sabun kapları sık temas edilen yüzeylerin kontamine olması sorumlu tutulmaktadır. Salgınların önlenmesinde eldiven ve önlük gibi koruyucu ekipmanların kullanımı, hastayla temas öncesi ve sonrasında dezenfeksiyon, invaziv işlemler sırasında sterilite ve hijyen kurallarına uyulması salgınları yavaşlatmaktadır. Bu nedenle dirençli mikroorganizmaların hastanede ve toplumda horizontal yayılımın önlenmesi için enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulmalıdır (254,255).

Metallo beta laktamazların coğrafik yayılımını, MBL üreten mikroorganizmaların enfeksiyonlarının önlenmesi ve optimum tedavi politikasının belirlemek amacıyla araştırmacıları bu enfeksiyonlar açısından risk faktörlerinin ve MBL üretiminin enfeksiyon üzerine etkisinin belirlenmesi yönünde çalışmalara yönlendirmiştir (5, 256-259).

2012 yılında yanık ve cerrahi alan enfeksiyonu etkeni olan 103 *P. aeruginosa* ve 39 *Acinetobacter* spp. izolatından fenotipik yöntemlerle MBL sıklığı ve MBL üretimi için risk faktörü olabilecek klinik özellikler araştırılmıştır. Çalışmada 33 *P. aeruginosa* ve 6 *Acinetobacter* spp. izolatında fenotipik olarak MBL üretimi saptanmıştır. MBL tespit edilemeyenlerle kıyaslandığında bu izolatların izole edildiği hastalarda greft uygulaması ve cerrahi girişim uygulamaları risk faktörü ( $p < 0.05$ ) olarak belirlenmiştir. MBL üreten ve

üretmeyen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. enfeksiyonları için ise sekiz günden daha uzun süreli hospitalizasyon, kateterizasyon, intravenöz damar yolunun bulunması, mekanik ventilasyon ve antibiyotik kullanımının ortak risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (256).

Zavascki ve ark. (257) 18 yaş altı hastalar ve kistik fibrozisli hataları çalışmadan dışlanarak enfeksiyon etkeni olduğunu belirledikleri 298 *P. aeruginosa* izolatında fenotipik testler kullanılarak MBL varlığını belirlenmiş ve MBL üreten *P. aeruginosa* izole edilen 86 hastada çeşitli klinik özellikleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda beta laktam grubu antibiyotik kullanımı ( $p < 0.001$ ), florokinolon kullanımı ( $p = 0.005$ ), nörolojik hastalık varlığı ( $p = 0.01$ ), üriner sistem enfeksiyonu olması ( $p = 0.01$ ), böbrek yetmezliğinin olması ( $p = 0.02$ ), yoğun bakım ünitesinde yatış ( $p = 0.03$ ) risk faktörleri olarak belirlenmiştir (257).

Horianopoulou ve ark. (258) ise VIM-2-üreten Gram negatif bakteri kolonizasyonu bulunan yoğun bakım hastalarında kolonizasyon açısından risk faktörü oluşturabilecek parametreleri değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında yoğun bakım hastalarının 29'unda çeşitli Gram negatif bakterilerin kolonizasyonun tespit etmişlerdir ve bunların altısında blaVIM-2-pozitif *P. aeruginosa* izolatı saptamışlardır. Karbapenem grubu ( $p = 0.01$ ) ve karbapenem dışı beta laktam grubu antibiyotiklerin kullanımının ( $p = 0.03$ ), 20 günden daha uzun süre yoğun bakım ünitesinde yatışın ( $p = 0.001$ ) blaVIM-2-pozitif gram negatif bakteri kolonizasyonu açısından risk faktörü oluşturduğunu bildirmişlerdir (258).

Noue'r ve ark. (259) ise çalışmalarında antibiyotik kullanımının özellikle kinolon grubu antibiyotiklerin kullanımının SPM pozitif çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* kolonizasyonu/enfeksiyonu için risk faktörü oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Zavascki ve ark (5) yaptıkları başka bir çalışmada ise 18 yaş altı hastalar ve kistik fibrozisli hastaları çalışmadan dışlayarak enfeksiyon etkeni olduğunu belirledikleri 298 *P. aeruginosa* izolatında fenotipik testler kullanarak MBL varlığını belirlemişler ve MBL üreten *P. aeruginosa* izole edilen 86 hastada mortalitenin artmış olduğunu rapor etmişlerdir (5). Bizim çalışmamızda ise pediatrik yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitif *P. aeruginosa* izolasyonunun mortaliteye etkisi veri sayısının yetersizliği nedeniyle değerlendirilememiştir. Erişkin yaş grubu yatan hastalarda ise MBL pozitif olan ve olmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda izolatlarda VIM ve IMP saptanmıştır ancak MBL alttıpleri belirlenememiştir. İleriki çalışmalarda izoelektrik fokuslama ya da sekans analizi gibi



yöntemler kullanılarak IMP ve VIM tipi MBL'lerin alt tipleri belirlenmelidir. Çalışmamıza dahil edilmiş olan hastaların ancak belirli bir kısmının klinik bilgilerine ulaşılabilmektedir. Özellikle vaka grubu hastaların büyük bir kısmının klinik bilgilerine ulaşılamadığından MBL varlığının hastaya ait klinik parametreler ve hastanın klinik prognozu üzerine etkisinin değerlendirilmesi kısıtlı sayıda veri ile yapılabilmektedir. Özellikle poliklinik grubu hastaların hiç birinde klinik dökümantasyona ulaşılamamış olması MBL pozitifliğinin toplumdaki etkisi değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda hastanemizde MBL sıklığı belirlenmiş olup yıllar içinde MBL sıklığında artışın olmadığı ve baskın MBL tipinin VIM lehine değiştiği gözlemlenmiştir. Gerek pediatrik gerekse erişkin hastalarda MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının hastane içi salgınlar oluşturduğu izlenmiştir. MBL pozitif *P. aeruginosa* izole edilen erişkin yaş grubu hastalarda hastanede yatış süresinin uzamış olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler hastane içi enfeksiyon kontrol programları ve tedavi politikalarının oluşturulmasında dikkate alınabilecek epidemiyolojik bir veri oluşturmuştur. Çalışmamız ülkemizde aynı anda iki farklı MBL tipi bulunduran *P. aeruginosa* izolatının tespit edildiğini bildiren ve MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarında klonal ilişkinin PFGE ile araştırıldığı ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılmış olan MHT'in ve imipenem/imipenem-EDTA KDT'nin bilinen MBL'leri saptamada yeterli olmadığı görülmüştür. Mevcut yöntemlerin modifikasyonu veya yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmüştür. Çalışmamızın sonucunda elde edilen bulgular epidemiyolojik veriler oluşturmuştur.

Çalışmamızın neticesinde gerek pediatrik gerekse erişkin yaş grubu yatan hastalarda MBL pozitif *P. aeruginosa* tespit edilen hastalar ile tespit edilemeyen hastalar arasında araştırılan klinik özellikler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak MBL pozitif *P. aeruginosa* izole edilen erişkin yaş grubu yatan hastalarda hastanede yatış süresi daha uzun bulunmuştur ( $p = 0.049$ ). Ayrıca erişkin yaş grubu yatan hastalarda ise MBL pozitif olan ve olmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na 2008-2010 yıllarında gönderilen çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiş 334 imipenem ve/veya meropeneme orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL sıklığının ve tiplerinin belirlenmesi, MBL tesbit edilen izolatlar arasında klonal ilişkinin PFGE ile araştırılması, MBL pozitif *P. aeruginosa* izole edilen hastalara ait çeşitli mikrobiyolojik, demografik ve klinik özelliklerin belirlenmesi ve bu özelliklerin MBL ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmanın neticesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları en sık (%51.8) yoğun bakım servislerinde, ikinci sıklıkta (%35.9) çeşitli servislerde ve daha az sıklıkta (%12.3) polikliniklerde takip edilen hastalardan izole edilmiştir.
2. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları sırasıyla solunum yolu (%49.4), genitoüriner sistem (%18.9), cilt ve yumuşak doku (% 17.6), kan (%8.4) ve diğer bölge (%19.0) örneklerinden izole edilmiştir.
3. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının %48.2'si piperasiline, %39.2'si piperasilin/tazobaktama, %46.7'si seftazidime, %47.5'i sefepime, %59.0'u aztreonama, %31.4'ü gentamisine, %15.3'ü amikasine ve %31.4'ü siprofloksasine dirençli bulunmuştur.
4. MHT ile MBL veya karbapenemaz üretimi izolatların % 6.3'ünde pozitif ve %47.6'sında negatif saptanırken, %46.1'inde değerlendirilememiştir.
5. Kombine disk testiyle MBL üretimi açısından izolatların %32.6'sında pozitiflik saptanmıştır.

6. Karbapenemlere dirençli 334 *P. aeruginosa* izolatının PZR ile 20 (%6.0)'sında sadece VIM, 9 (%2.7)'sında sadece IMP ve 3 (%0.9)'unda VIM ve IMP birlikte olmak üzere toplam 32 (%9.6)'sında MBL saptanmıştır.
7. Karbapenemlere dirençli 334 *P. aeruginosa* izolatının hiç birinde PZR ile GIM, SIM ve SPM tipi MBL'ler saptanmamıştır.
8. Çalışmamızda 2008 yılında MBL saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının hepsi (13) VIM; 2009 yılında saptananların dördü sadece VIM, üçü sadece IMP, üçü VIM ve IMP birlikte ve 2010 yılında tespit edilenlerin ise üçü VIM, üçü IMP tipi MBL taşımaktadır.
9. Üç yıl içinde MBL sıklığında azalma olduğu görülmüştür.
10. PZR ile kıyaslandığında MHT için duyarlılık %40.0, özgüllük %86.2, pozitif prediktif değer %28.6 ve negatif prediktif değer %5.7 olarak hesaplanmıştır.
11. PZR ile kıyaslandığında KDT için duyarlılık %90.6, özgüllük %73.5, pozitif prediktif değer %26.6 ve negatif prediktif değer %98.7 olarak hesaplanmıştır.
12. Pediatrik yaş grubu hastaların izolatlarının üçünde VIM, dördünde IMP ve birinde ise hem IMP hem de VIM tipi MBL tespit edilmiştir.
13. Pediatrik yaş grubu hastaların VIM tipi MBL tespit edilen izolatlarından üçü %90 ve üzeri oranda klonal ilişkili ve aynı anda VIM ve IMP saptanan bir izolat ise bu grup ile %78 ilişkili bulunmuştur.
14. Pediatrik yaş grubu hastaların IMP tesbit edilen izolatlardan ikisi arasında %83 oranında; başka bir izolat ile VIM ve IMP aynı anda pozitif olan bir izolat arasında %80 oranında klonal ilişki tespit edilmiştir.
15. Erişkin yaş grubu yatan hastaların 13'ünde VIM ve 4'ünde IMP tipi MBL saptanmıştır.
16. Erişkin yaş grubu yatan hastaların VIM tipi MBL tespit edilen izolatların 11'i arasında %90'a yakın oranda klonal ilişkili bulunmuştur.
17. Erişkin yaş grubu yatan hastaların IMP tespit edilen izolatlardan ikisi arasında %75 oranında klonal ilişki tespit edilmiştir.
18. Poliklinik hastalarının izolatlarından dördünde VIM, birinde IMP ve ikisinde VIM ve IMP birlikte saptanmıştır.

19. Poliklinik hastalarının izolatlarından VIM tipi MBL tespit edilen ikisi %88 ve VIM ve IMP birlikte pozitif olanlardan biri ise bunlarla %78 klonal ilişkili bulunmuştur.
20. Poliklinik hastalarının izolatlarından VIM ve IMP birlikte saptanan edilen iki izolat arasında %75 oranında klonal ilişki tespit edilmiştir.
21. Erişkin yaş grubu yatan hastalardan MBL pozitif *P. aeruginosa* izole edilenlerde enfeksiyondan sonra hastanede yatış süresinin MBL negatif *P. aeruginosa* izole edilenlere göre daha uzun olduğu belirlenmiştir ( $p=0.049$ ).

Çalışmamızda kullanılmış olan iki fenotipik testin bilinen MBL'leri saptamada yeterli olmadığı görülmüş ve bu konuda mevcut yöntemlerin modifikasyonu veya yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmüştür.

Hastanemizde yatan hastalarda ve poliklinik hastalarında MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarında MBL varlığı gösterilmiş olup MBL pozitif izolatlara ait klonlarının hastane içinde farklı servisler arasında ve toplumda yayılabildiği izlenmiştir. Ayrıca MBL pozitif *P. aeruginosa* saptanan erişkin hastalarda hastanede yatış süresinin uzamış olduğu görülmüştür. Poliklinik hastalarında MBL pozitif *P. aeruginosa* izolatlarının varlığı ve izolatlar arasında klonal ilişki tespit edilmesi, toplum içinde yayılımı düşündürmektedir. MBL pozitif izolatların toplumdaki sıklığının daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilmesi için yapılacak bölgesel ve ulusal çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sahip olduğu direnç mekanizması nedeniyle tedavi tercihleri kısıtlı olan bu mikroorganizmanın hastanemizde yayılımını önlemek için uygun enfeksiyon kontrol programlarının titizlikle uygulanması gerekmektedir.

## 7. ÖZET

### **METALLO-BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN KLİNİK *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİ**

Kazanılmış metallo beta laktamazların (MBL'lerin) özellikle *P. aeruginosa*'da ortaya çıkışı, bu enzimlerin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerin standardizasyonunun henüz sağlanamamıştır ve epidemiyolojik veri ve klinik deneyimin yetersiz olması nedeniyle artan bir endişe kaynağıdır. Bu çalışmada MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının mikrobiyolojik ve epidemiyolojik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya hastanemizde 2008 ve 2010 yılları arasında toplanmış olan karbapenemlere orta duyarlı/dirençli bulunan *P. aeruginosa* izolatları dahil edilmiştir. MBL varlığı çeşitli fenotipik testler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. MBL pozitif izolatların klonal ilişkisi Pulse Field Jel Elektroforezi (PFGE) ile incelenmiştir. Hastaların çeşitli klinik özellikleri, MBL pozitif *P. aeruginosa* varlığına göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Üç yüz otuz dört izolatın, Modifiye Hodge testi (MHT) 21'inde (%6.3), imipenem/imipenem-EDTA kombine disk testi (KDT) 109'unda (%32.6) ve PZR ise 32'sinde pozitif. PFGE analizi sonuçlarına göre, pediatrik yaş hastalarda izole edilmiş üç VIM pozitif izolat klonal ilişkili saptandı. Erişkin yaş yatan hastalardan izole edilmiş 11 VIM pozitif izolat klonal ilişkiliydi. Poliklinik hastalarından izole edilmiş iki VIM pozitif izolat klonal ilişkiliydi. MBL pozitif *P. aeruginosa* saptanan erişkin yaş yatan hastalarda hastanede kalış süresinin daha uzun olduğu saptandı ( $p$  değeri=0.049).

Sonuç olarak MBL'lerin toplumda ve hastane içinde yayılabildiği ve MBL pozitif *P. aeruginosa* saptanan erişkin yaş yatan hastalarda hastanede yatış süresinin uzadığı görülmüştür. Türkiye'de VIM ve IMP birlikte pozitif *P. aeruginosa*'nın rapor edildiği ilk çalışmadır.

## 8. SUMMARY

### EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF METALLO-BETA-LACTAMASE PRODUCING CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

The emergence of acquired metallo-beta-lactamases (MBLs) especially in *Pseudomonas aeruginosa* is an increasing concern because of the methods used to identify MBLs which have not been standardized yet, and insufficient epidemiological data and clinical experience for these enzymes. In this study we aimed to investigate the microbiologic and epidemiologic characteristics of *P. aeruginosa* producing MBL.

*P. aeruginosa* isolates that were intermediate resistant/resistant to carbapenems have been collected between 2008 and 2010 in our hospital were included in the study. The presence of MBL was investigated by a variety of phenotypic methods and Polymerase Chain Reaction (PCR). The clonally relationships of MBL positive isolates have been examined by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The clinical characteristics of patients were statistically analysed according to the presence of MBL positive *P. aeruginosa*.

Of 334 isolates, were positive 21 (6.3%) with modified Hodge Test (MHT), 109 (32.6%) with imipenem/imipenem-EDTA combined disk test (CDT) and 32 (9.6%) Polymerase Chain Reaction (PCR). According to PFGE analysis, three VIM positive isolates clonally related, which were identified from pediatric patients. Eleven VIM positive isolates were clonally related, which were identified from adult hospitalised patients. Two VIM positive isolates were clonally related, which were identified from adult outpatient. It was detected that hospital stay was longer for the adult hospitalised patients with MBL positive *P. aeruginosa* ( $p$  value =0.049).

In conclusion, it was observed that MBL-positive *P. aeruginosa* isolates could spread in the community or in the hospital, and also length of hospital stay was longer for the adult patients with MBL positive *P. aeruginosa*. This is the first study reporting both VIM and IMP positive *P. aeruginosa* in Turkey.

## 9. KAYNAKLAR

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH: The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67:351-68, 2007.
2. Lagatolla C, Edalucci E, Dolzani L, Riccio ML, De Luca F, Medessi E, Rossolini GM, Tonin EA. Molecular evolution of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2348-53, 2006.
3. Strateva T, Yordanov D: *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1133–1148, 2009.
4. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonomidis A, Sofianou D: Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.*, 53:1325-30, 2009.
5. Zavascki AP, Barth AL, Gonçalves ALS, Moro ALD, Fernandes JF, Martins AF, Ramos F, Goldani LZ: The influence of metallo- $\beta$ -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 387–392, 2006.
6. Pitt TL, Simpson AJH: *Pseudomonas and Burkholderia spp.* In Gillespie SH, Hawkey PM (Eds.): *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. John Wiley and Sons Ltd, UK; 2th ed, 2006, pp. 427-435.
7. Erdem B: *Pseudomonaslar*. Ustaçelebi, Ş: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi Ltd., Şti., Ankara, 1999, s. 551-558.
8. Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P, Poirel L. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clinical Microbiology and Infection*, 14:755-9, 2008.
9. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P: Metallo- $\beta$ -Lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 306–325, 2005.
10. Sa'nchez A, Gattarello S, Rello J: New treatment options for infections caused by multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-

- negative bacilli. *Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine*, 32: 151-158, 2011.
11. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM: Metallo- $\beta$  lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infectious Diseases*, 11: 381–93, 2011.
  12. Gupta V: Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Expert Opin Investig Drugs*, 17: 131-143, 2008.
  13. Maltezou HC: Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 405-7, 2009.
  14. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 282-283, 2004.
  15. Özgümüş OB, Çaylan R, Tosun İ, Sandallı C, Aydın K, Köksal İ: Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microbial Drug Resistance*, 13: 191-8, 2007.
  16. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cant'on R, Cauda R, Docquier J-D, Edelstein M, Fr`ere JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagoum V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM, on behalf of the ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 380–388, 2007.
  17. Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ, Limansky AS: Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- $\beta$ -lactamases in nonfermentative Gram-negative bacteria. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43 5648–5652, 2005.
  18. Hirsch EB, Tam VH: Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 10: 441–451 2010.
  19. Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E: Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 1132-47, 2009.
  20. Palleroni NJ: The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 12: 1377-83, 2010.



21. Palleroni NJ: Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, 149: 1-7, 2003.
22. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA: *Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria*. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, ed(s): *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, USA: 24th ed, 2007, pp. 263-267.
23. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: The nonfermentative Gram-negative bacilli, "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" (Ed. E.W. Koneman, S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn)'de 5.baskı, Lippincott, Philadelphia-New York, 1997, pp. 253-321.
24. Hill EB, Herry DA, Speert DP: *Pseudomonas* (çev. B Şener). A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Ed): *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology-çeviri)*'de. Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1: s. 734-748.
25. <http://www.sciencephoto.com/media/11581/enlarge>
26. Çıragil P, *Pseudomonas* ve İlişkili Bakteriler. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: *Medical Microbiology*. 6th ed. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier. 2008: 333-338
27. Palleroni NJ: *Pseudomonas*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G (Eds): *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, American Society for Microbiology, Washington DC, 10th ed. 2005, pp. 1591-1606.
28. Moore NM, Flaws ML: Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Laboratory Science*, 24: 43-46, 2011.
29. Zar H, Saiman L, Quittel L: Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *Journal of Pediatrics*, 126: 230-233, 1995.
30. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB: Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*, 271: 64-67, 1996.
31. Plotkowski MC, Costa AO, Morandi V, Barbosa HS, Nader HB, de Bentzmann S, Puchelle E.: Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 50: 183-190, 2001.
32. Pier GB, Ames P: Mediation of the killing of rough, mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis by the alternative pathway of complement. *Journal of Infectious Diseases*, 150: 223-228, 1984.

33. Holder IA, Neely AN, Frank DW, PcrV: Immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Infection and Immunity*, 69: 5908-5909, 2001.
34. Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells-Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 2187-2196, 1992.
35. Smith RS, Iglewski BH: *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *The Journal of Clinical Investigation*, 112: 1460-1465, 2003.
36. Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ: Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179: 3928-3935, 1997.
37. Morrison AJ, Wenzel RP: Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*, 6: 627-640, 1984.
38. Berthelot P, Grattard F, Mahul P: Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Medicine*, 27: 503-512, 2001.
39. Wilmoth D, Walters PE, Tomlin R, McCray SF: Caring for adults for cystic fibrosis. *Critical Care Nurse*, 21: 34-44, 2001.
40. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA: Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa* Part I: Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Source. *Chest*, 139: 909-919, 2011.
41. Pier G, Ramphal R: *Pseudomonas aeruginosa*, In "Principles and Practice of Infectious Diseases" (Ed. G. Mandel, J.E. Bennett, R. Dolin), Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005, pp. 2587-2615.
42. Vahaboğlu H, Akhan SÇ: *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. Nobel Tıp Kitabevi; İstanbul, Cilt 2, 2002, s.1608-1024.*
43. Ohl CA, Matthew P: *Pseudomonas aeruginosa* and Related Bacteria. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. (Eds). *Infectious Diseases*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 3th ed, 2004, pp. 1703 1717.
44. Erdem B: *Pseudomonaslar*. Ustaçelebi, Ş: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de*. Güneş Kitabevi Ltd., Şti., Ankara, 1999, s. 551-558.
45. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Barış Yayınevi; 1995, s.161-172.

46. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL: Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 528–534, 1995.
47. Sacha P, Wiczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E: Metallo- $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*-a novel mechanism resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 46: 137-142, 2008.
48. Bayram Y, Parlak M, Aypak C, Bayram İ: Three-year review of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van, Turkey. *International Journal of Medical Sciences*, 10:19-23, 2013.
49. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ & Aminoglycoside Resistance Study Groups: The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clinical Infectious Diseases*, 24: 46-62, 1997.
50. Vakulenko SB, Mobashery S: Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 430–450, 2003.
51. Livermore DM: Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34: 634–640, 2002.
52. Poole K: Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:479-487, 2005.
53. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ & the Aminoglycoside Resistance Study Group (1997): The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms – changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clinical Infectious Diseases*, 24: 46–62, 1997.
54. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y: Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 362: 1788-93, 2003.
55. El’Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C & Plesiat P: Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 1016–1021, 2007.
56. Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T: High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiology and Immunology*, 46: 391-395, 2002.

57. Jacoby GA: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41: S120-S126, 2005.
58. Hooper DC: Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 27: 54-63, 1998.
59. Hooper DC: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Disease*, 7: 337-341, 2001.
60. Masuda N, Ohya S: Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1847-1851, 1992.
61. Kong KF, Schneper L, Mathee K: Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *The Authors Journal Compilation, APMIS*, 118: 1-36, 2010.
62. Pechere JC, Kohler T: Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 5, 15-18, 1999.
63. Livermore DM:  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance clinical microbiology reviews. *American Society For Microbiology*, 8: 557-584, 1995.
64. Livermore DM: Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 247-25, 2001.
65. Tenover FC: Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* 34: 3-10, 2006.
66. Poole K: Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 12-26, 2004.
67. Nikaido H: Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases*, 27: 32-41, 1998.
68. Lambert PA: Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95: 22-26, 2002.
69. Livermore DM: Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 11-23, 2003.
70. Rice LB, Bonomo RA: The red menace: emerging issues in antimicrobial resistance in gram-negative bacilli. *Current Infectious Disease Reports*, 1: 338-346, 1999.
71. Rice LB, Bonomo RA: Antibakteriyel ilaçlara direnç mekanizmaları (çev D Gür). A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Ed): *Klinik Mikrobiyoloji'de*

(Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1:1114-1145.

72. Zhao WH, Hu ZQ: Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 36: 245-58, 2010.
73. Nordmann P, Guibert M: Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 128-131, 1998.
74. Bush K, Jacoby GA: Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 54: 969-976, 2010.
75. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P: Ambler class A extended-spectrum betalactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents Chemother*, 47: 2385-2392, 2003.
76. Bradford PA: What's new in beta-lactamases? *Current Infectious Disease Reports*, 3: 13-19, 2001.
77. Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V, Quentin C, Lambert N, Arlet G: Evaluation of the Osiris expert system for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 3712-3718, 2003.
78. Naas T, Nordmann P: OXA-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5: 865-879, 1999.
79. Queenen AM, Bush K: Carbapenemases: the versatile  $\beta$  lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 440-458, 2007.
80. Bush K: Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Diseases*, 27: 48-53, 1998.
81. Livermore DM, Woodford N: Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology*, 3: 489-495, 2000.
82. Poirel L, Nordmann P: Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3: 117-127, 2002.
83. Rasmussen BA, Bush K: Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 223-232, 1997.
84. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW: Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$  lactamase II structural gene. *Journal of Bacteriology*, 170: 2873-2878, 1988.

85. Chen YH, Succi J, Tenover FC, Koehler TM:  $\beta$ -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Journal of Bacteriology*, 185: 823–830, 2003.
86. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM: Sequence analysis of the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218: 199–201, 1994.
87. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, Frere JM, Amicosante G: Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* chromosomal gene (*bla*<sub>ACME</sub>) encoding an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2193–2199, 1999.
88. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P: Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3028–3034, 2000.
89. Boschi L, Mercuri PS, Riccio ML, Amicosante G, Galleni M, Frere JM, Rossolini GM: The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo- $\beta$ -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1538–1543, 2000.
90. Simm AM, Higgins CS, Pullan ST, Avison MB, Niumsup P, Erdozain O, Bennett PM, Walsh TR: A novel metallo- $\beta$ -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Letters*, 509: 350–4, 2001.
91. Mammeri H, Bellais S, Nordmann P: Chromosome-encoded  $\beta$ -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 3561–3567, 2002.
92. Rossolini GM, Condemi MA, Pantanella F, Docquier JD, Amicosante G, Thaller MC: Metallo- $\beta$ -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 837–844, 2001.
93. Naas T, Bellais S, Nordmann P: Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 267–273, 2003.
94. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, Henriques I, Alves A, Correia A: Sfh-1, a subclass B2 metallo- $\beta$ -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2330–2333, 2003.

95. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM: Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1584-1590, 1999.
96. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard JL, Nordmann P: Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 546–52, 2001.
97. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M: A novel integron-like element carrying the metallo-beta lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1612-1615, 1995.
98. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM: Integron encoded Int1 integrases preferentially recognise the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Molecular Microbiology*, 46: 1415-1427, 2002.
99. Bennett PM: Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 1-4, 1999.
100. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN: Evolution of an integron carrying *bla*<sub>VIM-2</sub> in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 116–9, 2003.
101. Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gotoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S: Virulence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1876-1878, 2004.
102. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR: Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla* IMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminated carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 583-590, 2003.
103. Partridge SR, Hall RM: The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *Journal of Bacteriology*, 185: 6371-6384, 2003.
104. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 147–51, 1991.

105. Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM: In70 of plasmid pAX22, a *bla*VIM-1-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1249–1253, 2001.
106. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR: Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 673–679, 2002.
107. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR: Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 582-587, 2003.
108. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR: Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4654–4661, 2004.
109. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y: Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 4485-91, 2005.
110. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR: Genetic and biochemical characterization an acquired subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*AIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 6154-9, 2012.
111. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases*, 10: 597-602, 2010.
112. Poirel L, Rodríguez-Martínez J-M, Naiemi NA, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P: Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 54: 2420–2424, 2010.
113. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N: Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 38: 71-8, 1994.



114. Jones RN, Deshpande LM, Bell JM, Turnidge JD, Kohno S, Hirakata Y, Ono Y, Miyazawa Y, Kawakama S, Inoue M, Hirata Y, Toleman MA: Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo- $\beta$ -lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49: 289-94, 2004.
115. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y: PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5407–13, 2003.
116. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodríguez-Noriega E, Sanchez A, Carrillo B, Esparza-Ahumada S, Silva-Sanchez J: Metallo- $\beta$ -lactamase gene *blaIMP-15* in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52: 2943-6, 2008.
117. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A: Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomospecies 3* from Korea: identification of two new integrons carrying the *blaVIM-2* gene cassettes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 837–40, 2002.
118. Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH: Occurrence of a new metallo- $\beta$ -lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiology Letters*, 194: 53–57, 2001.
119. Wang C, Wang J, Mi Z: *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases and carrying two aminoglycoside-modifying enzymes in China. *Journal of Hospital Infection*, 62: 522–24, 2006.
120. Yan J, Hsueh P, Ko W, Luh K, Tsai S, Wu H, Wu J: Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45: 2224-2228, 2001.
121. Koh TH, Khoo CT, Tan TT, Arshad MA, Ang LP, Lau LJ, Hsu LY, Ooi EE: Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes, including the novel *blaIMP-26* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 8: 2563-4, 2010.
122. Lin YC, Sheng WH, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Li SY: Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter genomospecies 3* and *Acinetobacter genomospecies 13TU* in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 439–43, 2010.

123. Hwa WE, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD: Detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem resistant isolates of *Acinetobacter* spp in Malaysia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 42: 54–62, 2009.
124. Khosravi Y, Tee Tay S, Vadivelu J: Metallo- $\beta$ -lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67: 294–96, 2010.
125. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y: IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 627–32, 2007.
126. Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF, Radwan HH: High prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Saudi Arabia. *Journal of Chemotherapy*, 21: 461–62, 2009.
127. Khosravi AD, Mihani F: Detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60: 125–28, 2008.
128. Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R. Isolation of the first metallo- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quimioter*, 21:123–26, 2008.
129. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM: Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet*, 353: 899–900, 1999.
130. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM: IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1522-8, 2003.
131. Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E, Spalla M, Li Bergoli M, Rossolini GM: Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3824-8, 2005.
132. Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, Di Gaetano V, Di Carlo P, Cipolla D, Corsello G, Cornaglia G: A novel VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 722-4, 2011.
133. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R: Acquired carbapenemases in

Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 112–22, 2010.

134. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN: Novel variant (blaVIM-4) of the metallo-beta-lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 4026–8, 2002.
135. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ: VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 981–3, 2006.
136. Sofianou D, Markogiannakis A, Metzidie E, Pournaras S, Tsakris A: VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24: 854–55, 2005.
137. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P: First identification of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 289–90, 2008.
138. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis L, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A: VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 5153–6, 2005.
139. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A: Detection of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1604–07, 2010.
140. Gacar GG, Midilli K, Kolayli F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, Karadenizli A, Vahaboglu H: Genetic and enzymatic properties of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 4400–4403, 2005.
141. Yildirim I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Journal of Chemotherapy*, 19: 467–68, 2007.
142. Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase PER-1 and metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 221–22, 2008.
143. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P: Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its

plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 891-7, 2000.

144. Hocquet D, Plesiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X, for the Observatoire National de l'Epidemiologie de la Resistance Bacterienne aux Antibiotiques: Nationwide investigation of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, and extended spectrum oxacillinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 3512–15, 2010.
145. Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Domínguez A, Oliver A, Pujol M, Gudiol F, Ariza J: Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 1026-9, 2007.
146. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG: Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 346-52, 2010.
147. Samuelsen O, Buarø L, Toleman MA, Giske CG, Hermansen NO, Walsh TR, Sundsfjord A: The first metallo- $\beta$ -lactamase identified in Norway is associated with a TniC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 331-2, 2009.
148. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A: VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 2977–79, 2008.
149. Valenza G, Joseph B, Elias J, Claus H, Oesterlein A, Engelhardt K, Turnwald D, Frosch M, Abele-Horn M, Schoen C: First survey of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 3493-7, 2010.
150. Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C: First organisms with acquired metallo- $\beta$ -lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2221–22, 2009.
151. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, O'Connor FS, Giesecke J, the European NDM-1 Survey Participants: New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Eurosurveillance*, 15: 19716, 2010.
152. Hrabák J, Cervená D, Izdebski R, Duljasz W, Gniadkowski M, Fridrichová M, Urbásková P, Zemlicková H: Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357

- producing the IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase in central Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 474-5, 2011.
153. Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR: *bla*VIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 2636–38, 2007.
  154. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM: First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 516–19, 2005.
  155. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR: Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*IMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac*(6')-30/*aac*(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4693–702, 2004.
  156. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MF, Woodford N: Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*IMP allele, *bla*IMP-7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6: 255-8, 2002.
  157. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JDD: Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing strains. *Journal of Infectious Diseases*, 192: 1606–12, 2005.
  158. Pitout JDD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL: Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45: 294–298, 2007.
  159. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20<sup>th</sup> Informational Supplement, 2010, M100-S20. CLSI.
  160. Migliavacca R, Docquier J-D, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L. Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40: 4388–4390, 2002.
  161. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure J-A, Le P, Church DL: Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43: 3129–3135, 2005.

162. 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. *Clinical Microbiology and Infection*, 7: 88-91, 2001.
163. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y: Evaluation of the Hodge Test and the imipenem-EDTA Double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4623–4629, 2003.
164. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y: Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3798–3801, 2002.
165. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL: Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49: 5-11, 2004.
166. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A: Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2755–2759, 2002.
167. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Karlsson Å, Chong Y: Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 942-944, 2005.
168. Toleman MA, AM Simm, TA Murphy, AC Gales, DJ Biedenbach, RN Jones, TR Walsh: Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 673–679, 2002.
169. Zaoutis TE, Goyal M, Chu JH, Coffin SE, Bell LM, Nachamkin I, McGowan KL, Bilker WB, Lautenbach E: Risk factors for and outcomes of bloodstream infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in children. *Pediatrics*, 115: 942, 2005.
170. Richard B, Thomson JR, Speert DP: Bakteriyolojik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve İşleme Alınması (çev Şenses Z). A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, Tanyüksel M (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1: 291-333
171. Carroll KC, Weinstein MP: Mikroorganizmaların Saptanma ve Tanımlanmasında Manuel ve Otomatik Sistemler (Çev G Haşçelik), A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical

microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1:192-217.

172. 48-[http://www.bd.com/ds/productCenter/445475\\_allCLSI\\_Procedures.asp](http://www.bd.com/ds/productCenter/445475_allCLSI_Procedures.asp)
173. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, Morello JA, Leitch CD, Matushek S, Schwabe LD, Dorigan F, Kocka FE: Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 552-557, 1993.
174. Schreckenberger PC, Lindquist D: Aerobik Gram Negatif Bakterilerin İdentifikasyonu İçin Algoritmalar (Çev Fındık D): Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (Ed): Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology-çeviri) İçinde. Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1: 371-376.
175. <http://www.bd.com/europe/regulatory/documents.asp?i=314>
176. O'Hara CM: Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 928-933, 2006.
177. Petti CA, Carrol CK, Reimer LG: Mikroorganizmaların Saklanma Yöntemleri (Çev Kaşifoğlu N): Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, 1:55-61.
178. Robson RL, Essengue S, Reed NA, Horvat RT: Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58: 185-90, 2007.
179. Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC: Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of non fermentative Gram-negative bacteria. *Indian Journal of Medical Research*, 129: 707-12, 2009.
180. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S: Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 544-547, 2007.
181. Toleman M, Biedenbach D, Bennett D, Jones R, Walsh T: Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 61-70, 2005.

182. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou M, Babini G, Douboyas J, Livermore D: Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1290-1292, 2000.
183. Barth AL, Pitt TL: Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 37-40, 1995.
184. Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R: Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *American Journal of Infection Control*, 34: 188-92, 2006.
185. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A: The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 625: 372-7, 2009.
186. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Heersma HSS, Dijkshoorn L: Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 62: 4328-4335, 2005.
187. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Noue'r SA, Oliveira MP, Sampaio JLM, Freitas ADA, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM: Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2420-4, 2002.
188. CHEF-DR<sup>®</sup> III Pulsed Field Electrophoresis Systems Instruction Manual and Applications Guide, Catalog Numbers 170-3690 through 170-3703, BIO-RAD, U.S.
189. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2233-223, 1995.
190. Goering RV: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (çeviri Tekeli A): Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ (Ed): *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar'da* (Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice-çeviri Tekeli A, Ustaçelebi Ş). Palme Yayıncılık Ltd. Şti., Ankara, 2006, 185-196.
191. Ballarini A, Scalet G, Kos M, Cramer N, Wiehlmann L, Jousson O: Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BioMed Central Microbiology*, 12: 152, 2012.



192. Van EJ: Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 347-352, 2003.
193. Shu JC, Su LH, Chia JH, Huang SH, Kao YC, Lee SC, Wu TL: Identification of a hidden outbreak due to the spread of a VIM-3-producing, extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (XDRPA) clone at a regional hospital in Taiwan. *Epidemiology and Infection*, 1-4, 2012.
194. Onguru P, Erbay A, Bodur H, Baran G, Akinci E, Balaban N, Cevik MA: Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections. *Journal of Korean medical science*, 23: 982-7, 2008.
195. Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC: Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 340–5, 2002.
196. Furtado GHC, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, Wey SB, Medeiros EAS: Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: Risk factors and mortality. *Journal of Critical Care*, 24: 9–14, 2009.
197. Atilla A, Eroğlu C, Esen S, Sünbül M, Leblebicioğlu H: Investigation of the frequency of PER-1 type beta-lactamase and antimicrobial resistance rates in nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46: 1-8, 2012.
198. Adama HJ, DeCorbyb M, Renniec R, Karlowskya JA, Hobana DJ, Zhanelb GG, The Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA): Prevalence of antimicrobial resistant pathogens from blood cultures from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007–2009 study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69: 307–313, 2011.
199. Morfin-Otero R, Tinoco-Favila JC, Sader HS, Salcido-Gutierrez L, Perez-Gomez HR, Gonzalez-Diaz E, Petersen L, Rodriguez-Noriega E: Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Research Notes*, 5: 277, 2012.
200. Gupta V, Sidhu S, Chander J: Metallo- $\beta$ -lactamase producing nonfermentative gram-negative bacteria: An increasing clinical threat among hospitalized patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 718-721, 2012.
201. Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A: Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM in a level I Iranian burn hospital. *Burns*, 36: 826–830, 2010.

202. Aoga'in MM, Kulah C, Rijnsburger M, Celebi G, Savelkoul PHM, O'Gara F, Mooij MJ: Characterization of imipenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 262–265, 2012.
203. Inan A, Ozgultekin A, Akcay SS, Engin DO, Turan G, Ceran N, Dincer E, Aksaray S, Goktas P, Erdem I: Alterations in bacterial spectrum and increasing resistance rates in isolated microorganisms from device-associated infections in an intensive care unit of a teaching hospital in Istanbul (2004–2010). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65: 146-151, 2012.
204. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J: Phenotypic detection of metallo- $\beta$ -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Scientific World Journal*, 7, 2012.
205. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M: Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1): 40–43, 2000.
206. Siemann S, Brewer D, Clarke AJ, Dmitrienko GI, Lajoie G, Viswanatha T: IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1571: 190-200, 2002.
207. Heinza U, Adolphb HW: Metallo- $\beta$ -lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 2827–2839, 2004.
208. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V: Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo- $\beta$ -lactamase production in clinical isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 121: 780-783, 2005.
209. Rajput A, Saxena R, Singh KP, Kumar V, Singh S, Gupta A, Singh RK: Prevalence and antibiotic resistance pattern of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients-experience of an Indian Tertiary Care Hospital. *Journal of Burn Care & Research*, 31: 264-268, 2010.
210. Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Malik N, Zia F: Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran. The Journal of Microbiology*, 3: 189-193, 2011.
211. Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S: *bla*IMP and *bla*VIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6: 757-762, 2012.
212. Çakar A: Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri' nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik

yöntemlerle araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı. Ankara, 2005.

213. Tetik T: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen Gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo betalaktamaz enzim aktivitesinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Isparta, 2008.
214. Saraç G: Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenem direnci ve direncin moleküler olarak saptanması. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı. Mersin, 2011.
215. Franceschini N, Caravelli B, Docquier JD, Galleni M, Fre`Re JM, Amicosante G, Rossolini GM: Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3003–3007, 2000.
216. Scheffer MC, Bazzo ML, Steindel M, Darini AL, Clímaco E, Dalla-Costa LM: Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43:367-371, 2010.
217. Saha R, Jain S, Kaur IR: Metallo beta-lactamase producing *Pseudomonas* species-a major cause of concern among hospital associated urinary tract infection. *Journal of the Indian Medical Association*, 108: 344-8, 2010.
218. Altöparlak U, Aktas F, Celebi D, Özkurt Z, Akcay MN: Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*, 31: 707–710, 2005.
219. Samuelsen Ø, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnæs B, Sundsfjord A: Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3139–3144, 2008.
220. Qu T, Zhang J, Wang J, Tao J, Yu Y, Chen Y, Zhou J, Li L: Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *Journal Of Clinical Microbiology*, 7: 1136–1142, 2009.
221. Poirel L, Yakupoğullari Y, Kizirgil A, Dogukan M, Nordmann P: VIM-5 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* from Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 287, 2009.
222. Çelik N: Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.

223. Kavruk U: Hastane kaynaklı Gram negatif non fermentatif bakterilerde antibiyotik direnci, antibiyotik direnç mekanizmaları ve antibiyotik direnç gelişimine neden olan risk faktörlerinin belirlenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servis Şefliği, İstanbul, 2007.
224. Bozçal E: Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının metallo-beta-laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009.
225. Lee K, Kim CK, Hong SG, Choi J, Song S, Koh E, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y: Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo-beta-lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36: 259–263, 2010.
226. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM: blaVIM-2 cassette containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1053–8, 2002.
227. Lee K, LeeWG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y: VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerging Infectious Disease Journal*, 9: 868–71, 2003.
228. Giske CG, Rylander M, Kronvall G: VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3034–5, 2003.
229. Lagatolla C, Tonin E, Monti-Bragadin C, Dolzani L, Gombac F, Bearzi C, Edalucci E, Gionechetti F, Rossolini GM: Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. *Emerging Infectious Disease Journal*, 10: 535–8, 2004.
230. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y: Metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5256–63, 2004.
231. Yatsuyanagi J, Saito S, Ito Y, Ohta K, Kato J, Harata S, Suziki N, Amano K: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harboring the blaVIM-2 metallo-beta-lactamase gene in Akita Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57: 130–2, 2004.
232. Walsh TR: Clinically significant carbapenemases: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21: 367–71, 2008.

233. Polotto M, Casella T, Oliveira MGL, Rúbio FG, Nogueira ML, Almeida MTG, Nogueira MCL: Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infectious Diseases*, 12: 2-8, 2012.
234. Qnones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Vila AJ, Viale AM, Bermejo-Morales K, Limansky AS: Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-beta-lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 126-31, 2010.
235. Yang CH, Cheng YH, Chang HW, Chuang LY: Primer design with specific PCR product using particle swarm optimization. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3: 18-23, 2010.
236. Burpo FJ: A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. *Biochemistry*, 218: 1-12, 2001.
237. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F: Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics*, 65: 825-829, 2010.
238. Pasteran F, Veliz O, Faccione D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, Corso A: A simple test for the detection of KPC and metallo- $\beta$ -lactamase carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1438-1440, 2011.
239. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A: Sensitive and specific Modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 4301-4303, 2011.
240. Oh E, Lee S, Park Y, Park J, Park K, Kim S, Kang M, Kim B: Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University Hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 411-418, 2003.
241. Bergès L, Rodriguez-Villalobos H, Deplano A, Struelens MJ: Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and Etest for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 812-3, 2007.
242. Manoharan A, Chatterjee S, Mathai D, SARI Study Group: Detection and characterization of metallo beta lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Microbiology*, 3: 241-244, 2010.

243. van der Bij AK, Mol M, van Westreenen M, Goessens WH, Pitout JD: The laboratory diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* that produce metallo- $\beta$ -lactamases in a Dutch tertiary care centre. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 43: 596-602, 2011.
244. Yong D, Lee Y, Jeong SH, Lee K, Chong Y: Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 3227-32, 2012.
245. Lambert RJW, Hanlon GW, Denyer SP: The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 244–253, 2004.
246. Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC: Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of non fermentative Gram-negative bacteria. *Indian Journal of Medical Research*, 129: 707-12, 2009.
247. Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, Kronvall G, Rossolini GM: Establishing clonal relationships between VIM-1-Like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4309–4315, 2006.
248. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kamiska W, Dzieranowska D, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR: *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*VIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 451–456, 2004.
249. Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA: Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 269-73, 2009.
250. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T: Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 518–521, 2012.
251. Yoo JS, Yang JW, Kim HM, Byeon J, Kim HS, Yoo J Il, Chung GT, Lee YS: Dissemination of genetically related IMP-6-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in South Korea. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 300–304, 2012.
252. Andrei A, Zervos MJ: The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 130: 662-668, 2006.

253. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ: Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 512–530, 2006.
254. Yakupogullari Y, Otlu B, Dogukan M, Gursoy C, Korkmaz E, Kizirgil A, Ozden M, Durmaz R: Investigation of a nosocomial outbreak by alginate-producing pan-antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Infection Control*, 36: 13-18, 2008.
255. Kayabas U, Bayraktar M, Otlu B, Ugras M, Ersoy Y, Bayindir Y, Durmaz R: An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. *American Journal of Infection Control*, 36: 33-8, 2008.
256. Kumar SH, De AS, Baveja SM, Gore MA: Prevalence and Risk Factors of Metallo  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species* in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. *Journal of Laboratory Physicians*, 4: 39–42, 2012.
257. Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ: Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case–control studies in hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection*, 59: 96–101, 2005.
258. Horianopoulou M, Legakis NJ, Kanellopoulou M, Lambropoulos S, Tsakris A, Falagas ME: Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 1435–1439, 2006.
259. Noue'r SA, Nucci M, de-Oliveira MP, Pellegrino FLPC, Moreira BM: Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3663–3667, 2005.