

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*' NİN TANIMLANMASI VE  
METALLO-BETA-LAKTAMAZ ENZİMİNİN FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

**IDENTIFYING OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND  
DETECTION OF METALLO-BETA-LACTAMASE ENZYME  
BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS**

**SEZEN BİLEN**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

2010

# **PSEUDOMONAS AERUGINOSA' NIN TANIMLANMASI VE METALLO-BETA-LAKTAMAZ ENZİMİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

**Sezen Bilen**

## **ÖZ**

*Pseudomonas aeruginosa*, özellikle insanlarda oluşturdukları enfeksiyonlarının sıklığı ve çeşitliliği ile yüksek mortalite ve morbidite oranlarına neden olan önemli bir fırsatçı patojen olarak bilinmektedir. Günümüzde geniş spektrumlu pek çok antibiyotiğin yaygın kullanımına bağlı olarak *P. aeruginosa'* da yüksek oranda antibiyotik direnci gelişmekte ve etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Çoklu ilaç direnci taşıyan *P.aeruginosa'* nın, aminoglikozitler, kinolonlara ve karbapenemler dahil beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna karşı doğal direnç bulunmasının yanında, özellikle karbapenemlere karşı en önemli kazanılmış direnç mekanizması sahip oldukları metallo-beta-laktamazlardır.

Bu çalışmanın amacı, Ankara' daki üç farklı hastanenin farklı servislerinden ve farklı klinik materyallerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının belirlenmesi ve bu suşlarda metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle tanımlanmasıdır. *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları incelenerek, toplam 20 antibiyotip grubu oluşturuldu ve tüm *P.aeruginosa* suşlarında en yaygın antibiyotipin, 2 antibiyotiğe direnç gösteren antibiyotip 9 olduğu saptandı. İmipenem ve/veya seftazidime dirençli *P. aeruginosa* suşları belirlenerek, MBL enziminin tanımlanmasında kullanılan fenotipik yöntemlerden biri olan kombine disk testi ile 44 *P.aeruginosa* suşunun %55' inde MBL enzimi tespit edildi. *P.aeruginosa* suşlarında *bla<sub>VIM</sub>* genine özgü PCR analizine göre, çalışmaya alınan 44 izolatin MBL sıklığının %48 olduğu belirlendi. MBL enzimi üreten *P.aeruginosa* suşları her üç hastanede de saptanırken, en yüksek oranın Hastane 2' de görüldüğü ve bu suşların toplam 11 antibiyotiğe de direnç gösteren antibiyotip 20 paternini verdiği dikkat çekti. MBL enzimi ürettiği saptanan suşların, en sık genel yoğun bakım ünitesinden ve idrar örneklerinden izole edildiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *P. aeruginosa*, antibiyotikleme, metallo-beta-laktamaz

**Danışman:** Öğr. Gör. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı.

# IDENTIFYING OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND DETECTION OF METALLO-BETA-LACTAMASE ENZYME BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

**Sezen Bilen**

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa*, which causes high morbidity and mortality rate with the infections especially on humans, is known as a primal pathogen. Due to the recent excessive use of extended spectrum antibiotics, *P. aeruginosa* is getting more resistance to antibiotics and treating the infections caused by it is getting more obstinate. In addition to multi-drug resistant *P. aeruginosa* has very high intrinsic resistance to aminoglycosides, quinolons and most of beta-lactam antibiotics including carbapenems, metallo-beta-lactamase is its extrinsic resistance to beta-lactam agents especially carbapenems.

The aim of this study is to identify metallo-beta-lactamase enzyme in detected *P.aeruginosa* strains, isolated from different clinical materials and services of three hospitals in Ankara, by phenotypic and genotypic methods. For this purpose, 20 antibiotype groups were generated by examination of antibiotic susceptibilities of *P.aeruginosa* and most common antibiotype is detected as antibiotype 9, which is resistant to 2 antibiotics. According to this, with determining the *P.aeruginosa* strains resistant to imipenem and/or ceftazidim, with combined disk method, which is used for identification of MBL enzyme phenotypically, 55% of 44 *P.aeruginosa* strains MBL enzyme was found. According to PCR analysis from *bla<sub>VIM</sub>* gene in *P.aeruginosa* strains, the MBL frequency was detected as 48%. *P.aeruginosa* strains producing MBL enzyme were detected in all three hospitals, highest rate was in Hospital 2 and these strains were patterned as antibiotype 20, which is resistant to 11 antibiotics. Strains producing MBL enzyme were isolated most commonly from intensive care units of hospitals and urine samples.

Key Words: *P. aeruginosa*, antibiotyping, metallo-beta-lactamase

Advisor: Öğr. Gör. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY, Hacettepe University, Faculty of Science, Biology Department, Biotechnology Section.

## TEŞEKKÜRLER

Bütün yüksek lisans ve tez çalışmalarım boyunca, sonsuz anlayışını benden hiçbir zaman esirgemedi, bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarımı her an destekleyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Öğr. Gör. Işıl SEYİS BİLKAY' a;

Tüm çalışmalarım boyunca desteğini esirgemedi, bilgi ve deneyimleri ile her an yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ' e;

Çalışmamın en önemli aşamasında bana destek veren sayın Prof. Dr. Burçin ŞENER' e ve deneyimleri ile yol gösteren sayın Dr. Aslı ÇAKAR' a;

Arkadaştan çok öte bir kardeş, bir dost olan, hem hayatımın her anında hem de tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini bir an bile esirgemedi yanımda olan canım dostum Sinem DİKEN' e;

Manevi destekleri ile yanımda olan sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Demet ERDÖNMEZ, Araş. Gör. N. Hande AVCIOĞLU, Araş. Gör. Neslihan İDİL ve Araş. Gör. Doruk ARACAGÖK' e;

Manevi desteğini hiçbir zaman esirgemedi, sevgisiyle arkadaşlığımızı pekiştiren sevgili arkadaşım Araş. Gör. Gülcan Özbakır' a;

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemedi, büyük özveriyle çalışan özel çalışma öğrencilerimiz Alev URHAN ve Özgecan ERDEM' e;

Varlığını her an yanımda hissettiğim, beni her nerede olursa olsun sevmekten ve korumaktan asla vazgeçmediğini bildiğim, biricik meleğim annem Nilgün BİLEN' e;

Bütün hayatım boyunca sonsuz sevgisi ve fedakarlığı ile benim için bir babanın ötesinde anlamlar ifade eden bitanecik babam K. Bülent BİLEN' e;

Canımın yarısı, hayatımın en özel insanı canım ablam Ahsen TUĞRUL ile sevgi ve desteğiyle beni yüreklendiren canım abim Ümit TUĞRUL'a; beni bugünlere getiren ve hakkı hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım anneannem Tefrika TURHAN' a;

Sihirli elleriyle hayatıma ışık saçan, yaşamımın hem en mutlu hemde en acı günlerinde beni bir an için bile yalnız bırakmadan beni sımsıkı sarıp sarmalayan, sonsuz sevgi ve anlayışını benden hiçbir zaman esirgemeyen canım nişanım Yasin ÖZYÜREK' e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİ.....	5
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.1.2. Kültür Özellikleri.....	6
2.1.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	7
2.1.4. Virülans Faktörleri.....	7
2.1.4.1. Bakteriyel Bağlanma ve Kolonizasyon.....	7
2.1.4.2. Bölgesel İnvazyon.....	9
2.1.4.3. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonları.....	12
2.1.5. Quorum Sensing.....	18
2.1.6. <i>P.aeruginosa</i> ' nın Epidemiyolojisi.....	18
2.2. Hastane Enfeksiyonları.....	19
2.3. Antibiyotiklerin Genel Özellikleri.....	20
2.3.1. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler.....	21
2.3.2. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler ve Özellikleri.....	22
2.3.2.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler.....	22
2.3.2.2. Sefalosporinler.....	23
2.3.2.3. Kinolonlar.....	24

2.3.2.4. Aminoglikozidler.....	25
2.3.2.5. Tetrasiklinler.....	26
2.3.2.6. Karbapenemler.....	27
2.4. <i>P. aeruginosa</i> ' da Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	29
2.4.1. Biyofilm oluşumundan dolayı direnç.....	30
2.4.2. Hedef PBP moleküllerinin değişmesi.....	30
2.4.3. Dış Membran Geçirgenliği.....	31
2.4.4. Aktif Pompalama Sistemi ile İlacın Dışarı Atılması.....	31
2.4.5. Beta-Laktamazlar.....	32
2.5. Karbapenemazlar.....	34
2.5.1. Metallo-Beta-Laktamazlar.....	34
2.5.1.1. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-Beta-Laktamazlar.....	36
2.5.1.2. Transfer edilebilir Metallo-Beta-Laktamazlar.....	36
2.6. Metallo-Beta-Laktamazların Araştırılması.....	40
2.6.1. Modifiye Hodge Testi.....	41
2.6.2. Çift Disk Sinerji Testi.....	42
2.6.3. Kombine Disk Testi.....	42
2.6.4. E Testi.....	42
2.6.5. Mikrodilüsyon Testi.....	42
2.6.6. Moleküler Yöntemler.....	43
3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLERİ.....	44
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	44
3.2. <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Tanımlanması.....	44
3.2.1. <i>Pseudomonas</i> Suşlarında Laktoz Fermentasyonunun ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi.....	44
3.2.2. Kanlı Agarda Beta-Hemolizin ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi.....	45

3.2.3. <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Gram Boyama Yöntemi ile Mikroskopik İncelenmesi.....	46
3.3. <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Tanımlanmasında Uygulanan Diğer Biyokimyasal Testler.....	47
3.3.1. IMVC Testleri.....	47
3.3.1.2. İndol Testi.....	47
3.3.1.3. Metil Kırmızısı Testi.....	48
3.3.1.4. Voges-Proskauer Testi.....	49
3.3.1.5. Sitrat Testi.....	50
3.3.2. TSI (Triple Sugar Iron-Üç Demirli Şeker) Testi.....	50
3.3.3. Üre Hidrolizi Testi.....	51
3.3.4. Nitrat Redüksiyonu Testi.....	52
3.3.5. Oksidaz Testi.....	53
3.3.6. 42°C' de Üreme Testi.....	54
3.4. Ceftrimide agar ile <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Tanımlanması.....	54
3.5. Tür Düzeyinde Tanımlanan <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Uygun Koşullarda Saklanması.....	55
3.6. Antibiyotipleme.....	56
3.6.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri.....	56
3.6.2. Antibiyotiplerin Belirlenmesi.....	57
3.6.3. Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Belirlenmesi.....	57
3.7. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	57
3.8. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarının Hastanelerdeki Servislere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	58
3.9. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Hastaların Cinsiyetine Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	58
3.10. Metallo-beta-laktamazların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması....	58
3.10.1. Metallo-beta-laktamazların Kombine Disk Testi ile Fenotipik Olarak Tanımlanması.....	59

3.10. 2. Metallo-beta-laktamazların Genotipik Olarak Tanımlanması.....	59
3.10.2.1. DNA İzolasyonu.....	60
3.10.2. 2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	60
3.10.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile PCR Ürünlerinin Analizi.....	62
4.SONUÇLAR.....	63
4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Belirlenmesi.....	63
4.2. Antibiyotipleme.....	66
4.2.1. Antibiyotik Duyarlılık Paternlerinin Belirlenmesi ve Antibiyotipleme.....	66
4.2.2. Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi.....	72
4.3. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	74
4.4. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Servislere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	77
4.5. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Hastaların Cinsiyetine Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	79
4.6. Metallo-beta-laktamazların Kombine disk Testi ile Fenotipik Olarak Belirlenmesi.....	79
4.7. Metallo-beta-laktamazların Genotipik Olarak Belirlenmesi.....	81
5. TARTIŞMA.....	84
6. KAYNAKLAR.....	101

## ÖZGEÇMİŞ



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aztreonamın moleküler yapısı.....	22
Şekil 2.2. Piperasilinin moleküler yapısı.....	23
Şekil 2.3. Seftazidimin moleküler yapısı.....	24
Şekil 2.4. Sefepimin moleküler yapısı.....	24
Şekil 2.5. Siprofloksasinin moleküler yapısı.....	24
Şekil 2.6. Amikasinin moleküler yapısı.....	25
Şekil 2.7. Tobramisinin moleküler yapısı.....	25
Şekil 2.8. Tetrasiklinin moleküler yapısı.....	26
Şekil 2.9. İmipenemin moleküler yapısı.....	28
Şekil 2.10. Meropenemin moleküler yapısı.....	29
Şekil 3.1. <i>Pseudomonas</i> suşlarının MacConkey agardaki koloni morfolojisi.....	46
Şekil 3.2. <i>Pseudomonas</i> suşlarının kanlı agardaki koloni morfolojisi ve beta-hemolizi.....	46
Şekil 3.3. <i>Pseudomonas</i> suşlarının Gram boyama yöntemi ile mikroskopik görüntüsü.....	47
Şekil 3.4. İndol testi sonuçları.....	48
Şekil 3.5. Metil-kırmızısı testi sonuçları.....	49
Şekil 3.6. Sitrat testi sonuçları.....	50
Şekil 3.7. <i>Pseudomonas</i> suşlarının TSI besiyerindeki negatif test sonucu.....	51
Şekil 3.8. Üre testi sonuçları.....	52
Şekil 3.9. Nitrat testi sonuçları.....	53
Şekil 3.10. Oksidaz testi sonuçları.....	54
Şekil 3.11. ile <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Ceftrimide agardaki görüntüsü.....	55
Şekil 3.12. Agoraz jele örneklerin yüklenmesi.....	62
Şekil 4.1. Hastane 1' e ait antibiyotip dağılım oranları.....	70
Şekil 4.2. Hastane 2' ye ait antibiyotip dağılım oranları.....	70

Şekil 4.3. Hastane 3' e ait antibiyotip dağılım oranları.....	71
Şekil 4.4. Üç hastaneye ait antibiyotip dağılım oranları.....	71
Şekil 4.5. Hastane 1' e ait antibiyotik direnç oranları.....	72
Şekil 4.6. Hastane 2' ye ait antibiyotik direnç oranları.....	73
Şekil 4.7. Hastane 3' e ait antibiyotik direnç oranları.....	73
Şekil 4.8. Üç hastaneye ait toplam antibiyotik direnç oranı.....	74
Şekil 4.9. Hastane 1' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı.....	75
Şekil 4.10. Hastane 2' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı.....	75
Şekil 4.11. Hastane 3' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı.....	76
Şekil 4.12. Tüm hastanelerden elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı.....	76
Şekil 4.13. Hastane 1' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı.....	77
Şekil 4.14. Hastane 2' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı .....	78
Şekil 4.15. Hastane 3' den elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı.....	78
Şekil 4.16. Üç hastaneden elde edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı.....	79
Şekil 4.17. Üç hastanedeki <i>P. aeruginosa</i> suşlarının elde edildiği hastaların cinsiyetlerine göre dağılım oranları.....	80
Şekil 4.18. İmipenem ve/veya sefdazidime dirençli suşlar arasında kombine disk testi ile MBL enzimi pozitif veren <i>P. aeruginosa</i> suşlarının oranı.....	80
Şekil 4.19. Fenotipik olarak MBL ürettiği tespit edilen 24 <i>P. aeruginosa</i> suşunun PCR analiz sonuçları.....	83
Şekil 4.20. İmipenem ve/veya sefdazidime dirençli <i>P.aeruginosa</i> suşları arasında <i>bla<sub>VIM</sub></i> geni saptanan suşların oranı.....	82
Şekil 4.21. MBL enzimi ürettiği saptanan 21 <i>P.aeruginosa</i> suşunun hastanelere göre dağılım oranları.....	82

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içerikleri ve zon çapları.....	56
Çizelge 3. 2. PCR karışım içeriği ve konsantrasyonları.....	61
Çizelge 3. 3. PCR Döngüsü.....	61
Çizelge 4.1. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyaller ve hastaların cinsiyeti ile üreaz testi sonuçları.....	63
Çizelge 4.2. <i>P.aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve antibiyotip grupları.....	67
Çizelge 4.3. Kombine disk testi ile MBL enzimi pozitif olan suşlar.....	81

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AK: Amikasin

ATM: Aztreonam

BHI: Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyeri

CAZ: Sefdazidim

CIP: Siprofloksasin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

EMB: Eozin Metilen Blue Agar

FEB: Sefepim

IMP: İmipenem

kb: Kilobaz

MEM: Meropenem

MBL: Metallo-beta-laktamaz

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PIP: Piperasilin

R: Resistant

S: Sensitive

TBE: Tris-Borat-EDTA

TE: Tetrasiklin

TMP-SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol

TSI: Üç Şekerli Demir Besiyeri

TOB: Tobramisin

VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase



## 1. GİRİŞ

*P. aeruginosa* ilk olarak 1850' de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmış ve 1882' de Gessard' ın çalışmaları ile saf kültür olarak izole edilmiştir (Akoğlu, 2006). *P.aeruginosa*, özellikle immün sistemi baskılanmış kişiler için en önemli nozokomiyal fırsatçı patojendir. Toprak, su, bitkiler, hayvanlar ve insanlardan izole edilebilen *P.aeruginosa*' nın besin maddelerine olan gereksinimleri oldukça düşüktür. Bu nedenle su ve kimyasal dezenfektanlarda dahi varlığını sürdürebilir. İlave olarak, *P. aeruginosa* farklı çevre koşullarına olan uyumu nedeniyle de önemli bir fırsatçı patojendir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

*P.aeruginosa* sahip olduğu lakton ve diğer sinyal molekülleri aracılığıyla, çevresini algılama ve kendi yoğunluğunu ayırt etme özelliğine sahiptir. Bu düzenleyici sistem hücre yoğunluğuna bağlı biçimde koordine olarak, *P.aeruginosa*' nın hücre dışı virülans faktörlerini üretmesine imkan sağlar ve konağın immun yanıtını da etkileyerek daha invaziv enfeksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Hooi et al, 2004). Böylece yüzeysel deri enfeksiyonlarından sepsise kadar farklı klinik tablolara neden olarak, yüksek morbidite ve mortalitesi ile önemli bir insan patojenidir. Bu patojen, özellikle hastane ortamında, bağışıklık ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilir. Hastane enfeksiyonlarının %10-25' inden sorumlu tutulmaktadır (Bergagne, 2004).

Günümüzde geniş spektrumlu pek çok antibiyotiğin yaygın kullanımına bağlı olarak *P.aeruginosa*' da antibiyotik direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç göstermekte ve bu nedenle etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır (Pollack, 1995). Özellikle yoğun bakım birimlerinde pek çok antibiyotiğe yüksek oranda direnç gösteren ve çoklu ilaç direnç taşıyan *P.aeruginosa*' nın karbapenemler dahil beta-laktamların çoğu, aminoglikozitler ve kinolonlara karşı direnci %40' dan fazladır (Vahaboğlu, 2001).

*P.aeruginosa*' da, ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ve beta-laktamaz enzimleri ile pek çok antibiyotiğe karşı doğal direnç bulunmaktadır *P. aeruginosa*'da beta-laktam ajanlara, özellikle karbapenemlere

karşı dirençte rol alan en önemli kazanılmış direnç mekanizması ise sahip oldukları metallo-beta-laktamazlardır (Hyunjoo, 2001).

Moleküler sınıf B' de yer alan ve aktif bölgelerinde serin yerine bir  $Zn^{+2}$  iyonu bulunan MBL' ların bu farklı kimyasal yapıları nedeniyle klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta-laktamaz inhibitörleri ile baskılanamazlar (Bush et al., 1995; Yüce, 2001). Metallo-beta-laktamazların inaktivasyonu EDTA gibi bir metal şelatörü ile mümkün olur. En önemli özellikleri monobaktamlar dışında, tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilmeleridir (Nordmann and Poirel, 2002).

Metallo-beta-laktamazlar kromozomal yada transfer edilebilir şekilde bulunabilirler. Kromozomal MBL'ları içeren türler ile yayılabilen kromozomal MBL'ların aksine, kazanılmış ya da transfer edilebilen MBL'ların yayılımında çok büyük hızlanma görülmüştür. Transfer edilebilir MBL içinde en yaygın bulunanlar VIM, IMP, GIM, SPM ve SIM olarak belirtilebilir. Genellikle MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yanında aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan *aacA4* geni de bulunmaktadır. Böylece aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine de direnç gelişimi gözlenmektedir. Aminoglikozid ve beta laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrandan diğerine serbestçe dolaşabilir. Ancak bir organizmadan diğerine kendi başlarına hareket edemezler bu nedenle plazmidler ve transpozonlar gibi başka genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar (Walsh et al,2005).

Transfer edilebilen ilk MBL 1988 yılında Japonya'da *P. aeruginosa'* nın GN17203 suşunda ait konjugatif plazmit üzerinde bulunmuştur. İmipenemi parçaladığı için enzime IMP-1 adı verilmiştir (Poirel et al., 2000). IMP-1 *P. aeruginosa'* da tanımlanan ilk MBL' dir (Tsakris et al, 2000).

Kazanılan MBL' lerin ikinci önemli grubu VIM-tipi enzimlerdir. VIM tipi MBL üreten suşlar ilk olarak Avrupa ülkelerinde rapor edilmiştir. 1999 yılında İtalya' nın Verona şehrinde izole edilen VIM-1 enzimi *P. aeruginosa'* da tanımlanmıştır (Yatsuyanagi et al., 2004; Queenan and Bush, 2007). VIM-2 ise, 1996 yılında Güney Fransa' daki nötropenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P.aeuruginosa* suşunda tanımlanmıştır (Poirel et al., 2000). VIM varyantları içerisinde VIM-2 en yaygın olan VIM tipi enzimdir (Docquier et al., 2002). IMP ve VIM tipi transfer edilebilir MBL'lar

tüm dünyada yayılmaya devam ederken, SIM, GIM ve SPM tipi enzimlere halen ilk rapor edildikleri ülkeler dışında rastlanmamıştır (Queenan and Bush, 2007). Bu bağlamda MBL üreten Gram negatif basillerin tespit edilmesi hastalara en uygun tedavinin verilmesi ve direnç yayılımının kontrol altına alınması bakımından hayati önem taşır.

Çalışmamızda Ankara' daki üç farklı hastanenin farklı servislerinden ve farklı klinik materyallerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, beta-laktam grubunda bulunan ve karbapeneme dirençten sorumlu mekanizmalar arasında birinci sırada yer alan metallo-beta laktamaz enziminin hem fenotipik hemde genotip yöntemlerle tanımlanması ve bu yöntemler arasındaki uyumluluğun belirlenmesi amaçlandı. Bu nedenle öncelikle *Pseudomonas* suşlarının fenotipik teşhisi gerçekleştirildi ve ardından antibiyotiklere olan duyarlılıkları belirlendi. Çalışmamıza dahil edilen 90 *P. aeruginosa* suşunun antibiyotipleme yapılarak baskın suşlar saptandı. Bu suşların hastanelerin servislerine ve klinik materyallerine göre dağılım oranları karşılaştırılarak belirlendi.

*P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik dirençlilik durumlarına göre, imipenem ve/veya sefdazidime dirençli suşlar belirlenerek, MBL enziminin tanımlanmasında kullanılan fenotipik yöntemlerden biri olan kombine disk testi uygulandı. Çalışmamızın son aşamasında ise fenotipik olarak MBL enzimi ürettiği belirlenen 24 *P. aeruginosa* suşunda PCR metodu ile *bla<sub>VIM</sub>* genleri araştırıldı. Genotipik test sonucunda 24 *P. aeruginosa* suşunun 20' sinde *bla<sub>VIM</sub>* geni saptandı. Çalışmamızda beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminde sıklıkla karşılaşılan MBL enziminin belirlenmesinde kullandığımız fenotipik ve genotipik yöntemler birbirleri ile büyük oranda paralellik gösterdiği belirlendi.

Çalışmamızda hastane infeksiyon etkeni de olabilen *P.aeruginosa* suşlarında ülke genelinde ve tüm dünyada olduğu gibi yüksek oranda antimikrobiyal direnç ve çoğul direnç görüldü. Üç farklı hastanede de MBL enzimi üreten suşlar belirlendi. Bu suşlar hastaneler arasında karşılaştırıldı. MBL enzimi üreten bakterilerin erken ve doğru bir şekilde tespit edilerek, bu bakterilerin kontrolsüz yayılımlarının sınırlandırılması gerekmektedir. Ankara' daki ve Türkiye' deki MBL enzimi üreten suşların belirlenmesi ve kontrolü ile ilgili olarak daha ileri araştırmaların yapılması



gerekmektedir. Çalışmamız ise Ankara' da farklı hastanelerde bulunan MBL enzimi üreten suşların tespitini sağladığı için ileri araştırmalara katkı sağlayacaktır.

## 2.GENEL BİLGİ

*Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan *Pseudomonas* cinsinde suda, toprakta, çürük organik maddelerde ve bitkilerde yaşayabilen aynı zamanda insanlar, bitkiler ve hayvanlar için patojen olan türler bulunur. Besin ihtiyaçlarının basit olması nedeniyle her yerde kolaylıkla üreyebilirler. *Pseudomonas* cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni ise *Pseudomonas aeruginosa*'dır (Bilgehan, 1995; Baron and Finegold, 1994).

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* ilk olarak 1850' de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. Daha sonra *Bacillus pyocyaneus* ve *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmış ve piyosiyenin izolasyonu Lucke tarafından 1862' de yapılmıştır. Ancak Gessard' ın klasik çalışmaları ile 1882' de saf kültür olarak izole edilmiştir (Akoğlu., 2006).

*P.aeruginosa*, özellikle immün sistemi baskılanmış kişiler için en önemli nozokomiyal fırsatçı patojendir. Toprak, su, bitkiler, hayvanlar ve insanlardan izole edilebilen *P.aeruginosa*'nın besin maddeleri gereksinimleri oldukça düşüktür. Bu nedenle su ve kimyasal dezenfektanlarda dahi varlığını sürdürebilir. *P. aeruginosa*'nın ısı gibi değişik çevre koşullarına olan uyumu başarılı bir fırsatçı patojen olduğunu açıklamaktadır. DNA' sında ki G+C oranı %67.2'dir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

#### 2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

*P.aeruginosa* Gram negatif, 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5-0.8 µm genişliğinde, sporsuz, kapsülsüz, çiftli yada kısa zincirler halinde görülen basillerdir. Düz veya hafif eğri, uçları yuvarlak, çoğunlukla bir uçlarında bir veya nadiren iki ya da üç tane kirpik bulunan ve kirpiklerinden dolayı çok hareketli olan bakterilerdir. Rutinde kullanılan yöntemlerle kolay boyanırlar. Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları, R tipinde üreyenleri tarif edilmiştir (Bilgehan, 1995; Baron and Finegold, 1990).

### 2.1.2. Kültür Özellikleri

Laboratuvarlarda koyun kanlı agar, çukulata agar, Mueller-Hinton agar (MHA), endo ve Mac Conkey agar gibi uygun besiyerinde optimum 35–37°C' lerde ve düşük alkali ortamlarda ürerler. 42°C' de üreyebilme yeteneği *P. aeruginosa* için önemli bir özellik olan 42°C' de üreyebilmesi *P. fluorescens*' den ayırt edilmesini sağlar. Ancak 4°C' de üreyemezler. (Akoğlu., 2006; Bilgehan, 1995; Baron and Finegold, 1990). Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde yoğun ve homojen bir üreme gösterir ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti ile ayırt edilirler. Zorunlu aerobtur ancak denitrifikasyon yapma özelliğinden dolayı anaerob üreyen türlerde rastlanılabilir *P. aeruginosa* katı besiyerinde 3 tip koloni oluşturur. Tip 1 koloni, 2-3 mm çapında yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, yassı, beyaz renkli karşıdan bakılınca floresan özelliği olan, besiyerinin her tarafına yayılmış olan yeşil-mavi pigmentleri ile göze çarpan kolonilerdir. Bu tip koloniler genellikle klinik örneklerden izole edilir. Çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen tip 2 koloni, daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz koliform kolonilerine benzeyen kolonilerdir. Tip 3 koloni ise, *P. aeruginosa*' nın bazı suşlarının hücre dışı alginat salgılaması nedeniyle mukoid görünümde bakterinin oluşturduğu R kolonilerdir. Kültürlerde triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak karakteristik bir meyve kokusu vardır ve petri kutusunun kapağı açıldığında üzüm kokusu veya trimetilamin kokusu şeklinde hissedilir (Şen ve Halkman, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa*' nın tanısında oldukça önemli yer tutan çok çeşitli pigmentleri vardır. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar ve oda ısısında daha iyi meydana gelirler (Davis et al., 1968). Suda ve kloroformda çözünebilen mavi renkli piyosiyenin, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünebilen sarı-yeşil renkli piyoverdin, kırmızı renkli piyorubin ve kahverengi renkli piyomelanin olmak üzere dört farklı pigment yapabilir. Piyosiyenin, floresans vermeyen mavi renkte bir kimyasal maddedir. Bu mavi yeşil renk veren ekstrasellüler pigmenti *P. aeruginosa*' yı diğer *Pseudomonas*' lardan ayırır (Wilson and Sande., 2004). MacConkey agarda piyosiyenin pigmenti *P.aeruginosa* kolonilerinin mavi-yeşil görünmesine neden olur. Renkli olmasıyla beraber aynı zamanda floresan veren bir pigment olan piyoverdin ise *P.aeruginosa* ile birlikte diğer *Pseudomonas*

türlerinde de görülebilir. Hemoglobini tam olarak hidroliz edebildiğinden dolayı kanlı agarda beta-hemoliz yaparlar ve piyosiyanın pigmentinin varlığından dolayı karakteristik yeşil metalik röfle oluştururlar (Mahon and Manuselis.,2000).

### 2.1.3. Biyokimyasal Özellikleri

*P. aeruginosa'* nın oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden oksidaz testinin pozitif olmasıyla ayrılır. Glukozu oksidatif yolla parçalayıp asit yaparlar. Oksidasyon-Fermentasyon (OF) besiyerinde glukozu oksidatif yol ile yıkarlar, ancak fermente edemezler bu nedenle de açık tüpün rengini sarıya dönüştürürken kapalı tüpün renginde herhangi bir değişiklik meydana getirmezler. Laktoz ve sakkarozu kullanamazlar. İndol ve H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) tetstleri negatiftir. Nitratı nitrite veya azot gazına redükte ederler. Jelatin ve koagüle plazmayı eriterek parçalarlar, asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar. Nişastaya etki etmezler. L-arjinin dihidrolaz oluştururken, lizin-dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturamazlar. Potasyum siyanüre dirençlidirler. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens'* den ayrı olarak metilen mavisinin ve prontosilinin rengini giderir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002; Bilgehan,1995; Baron and Finegold, 1990; Vikipedi., 2010).

### 2.1.4. Virülans Faktörleri

*Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları 3 ayrı safhanın birleşimi ile ortaya çıkar.

1. Bakteriyel bağlanma ve kolonizasyon
2. Bölgesel invazyon
3. Sistemik hastalık (Bergagne 2004; Bilgehan 1995)

#### 2.1.4.1. Bakteriyel Bağlanma ve Kolonizasyon

*P.aeruginosa* kolonizasyonundan; kirpik, pili, lipopolisakkarit ve alginat gibi yapılar sorumludur.

- **Kirpik (Flagella)**

*P.aeruginosa'* nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamentöz bir uzantıdır. Bakterinin yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapılardır. Yaygın membran komponentleri aracılığı ile epitel hücresi membranına bağlanarak bakterinin

adezyonunu sağlarlar. Kirpik bakterinin kolonizasyonundaki başarısından sorumludur ve oldukça immunojenik bir yapıdır (Feldman et al, 1998; Mahenthiralingam et al,1994)

- **Fimbria (Pili)**

Bakterinin kısa ve filamentöz yüzey uzantılarıdır. Genelde prokaryot hücrelerde hareketten sorumlu olmamasına rağmen *P.aeruginosa*' da seğirme (twitching) şeklindeki hareketten sorumludur. Bakterinin üst solunum yolundaki epitel hücreler ile beraber diğer epitel hücrelere de hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur (Gupta et al, 1994). Bakteriye ait pililer, epitelyum hücre yüzeyindeki spesifik galaktoz, mannoz ve sialik asit reseptörlerine bağlanır ve patogeneizde kritik önem taşır (Todar, 2010).

- **Lipopolisakkarit kapsül (LPS)**

Hücre dışında bulunan bu tabakaya slime tabakası denilebildiği gibi glikokaliks veya ekzopolisakkarit olarak da tanımlanabilir. Bakteriyi konak savunmasından korur (Baştürk, 2005). Bakteri duvarının dış yüzeyinde yer alan bu tabaka fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. *P. aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında O-özgül polisakkarid zincirleri tanısal özelliktedir. Lipid A bileşeni ise birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder. Ayrıca polisakkarit kapsül *P.aeruginosa* enfeksiyonları için risk faktörü olan kistik fibrozis ve diğer kronik akciğer hastalıklarında bakterinin kolonizasyonunu da kolaylaştırır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

- **Alginate**

*P.aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapı olan alginate, tekrarlayan mannuronik asit ve glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Alginate, Lipopolisakkarit gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P.aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar. Alginatın aşırı üretimi bakteriyi fagositozdan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Hentzer et al., 2001). Alginate bazen bakteriyi çevreleyerek biyofilm tabakası

görevi görür ve biyofilm oluşturan bakteriler, oluşturmeyen bakterilere göre antibiyotiklere daha dirençlidir (Anvar et al., 1992).

#### 2.1.4.2. Bölgesel İnvazyon

- **Ekzotoksin A**

*P.aeruginosa* tarafından üretilen, tox A geni tarafından kodlanan ve 66kDa ağırlığında ekstrasellüler toksik bir proteindir (Callahan, 1976). *P. aeruginosa*' ya ait virülans faktörleri içinde en toksik olan ve en fazla çalışılan ekzotoksin A'dır. Yapay ökaryotik hücrelerinde sitotoksiktir ve çeşitli memeli hücreleri için öldürücüdür (Woods and Iglewski,1983). Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil-transferaz özelliği ile elongasyon faktör 2' yi etkileyerek hücredeki protein sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne yol açar. Etkeni *P.aeruginosa* olan kronik karaciğer enfeksiyonları, yanık, yara ve göz enfeksiyonlarında ekzotoksin A patojenik bir determinant olarak görülmektedir. İnsan vücudunda ekzotoksin A' ya karşı oluşmuş antikorların varlığının gösterilmesi ve oluşmuş bu antikorların başlangıçtaki yüksek titresi, hastalığın seyri ile ilişkilendirilmektedir (Woods et al., 1986).

- **Tip III Salgı Sistemi**

Ekzoenzim S, exo S geni tarafından kodlanan 43kDa büyüklüğünde ki ekstrasellüler bir proteindir (Coburn et al., 1991). *P.aeruginosa*' nın bazı suşları ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösteren bu ekzoenzim S' i üretirler. Ekzotoksin A'dan farklı olarak ekzoenzim S ısıya dayanıklıdır. Ayrıca doku hasarlarına neden olmaz ve bakterinin fagositler içinde öldürülmeden yaşamasını sağlar. Ekzoenzim S' in ekzotoksin A' dan diğer bir farkı ökaryotik proteinlerde ADP fosforilasyon aktivitesini katalizler (Sokol et al., 1981). ADP'nin ribozillenmesi için FAS (factor of activating protein) adında ökaryotik bir protein gereklidir (Coburn et al., 1991). Ekzoenzim S, akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına yol açar ve bakterinin yayılmasında önemli bir rol oynar (Karatuna ve Yağcı, 2008). Ekzoenzim S ile beraber Tip III salgılama sistemi tarafından salgılanan Ekzoenzim T, exo T geni tarafından kodlanır ve FAS' a bağlı ADP' yi ribozilleme özelliğine sahiptir (Iglewski et al., 1978). *P.aeruginosa* patojenitesinde ADP ribozillenmesinin rolü tam olarak bilinmesede, ekzoenzim S' in epitel hücrelerine zarar verdiği ve enfekte ettiği

konakta yayılması için gerekli olduğu bilinmektedir (Nicas et al., 1985; Kang et al.,1997).

Ekzoenzim Y bir adenilat siklazdır ve konak sitozolüne verildiğinde cAMP' yi artırır. Böylece pulmoner vasküler hücrelerde, hücreler arası boşluk oluşumu artar ve bu da geçirgenliğin artmasına neden olur. Ekzoenzim U, fosfolipaz ve lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar (Karatuna ve Yağcı, 2008).

#### • Proteazlar

*P. aeruginosa'* nın patogenezinde rol oynayan en önemli virülans faktörleri arasında elastaz ve alkali proteaz bulunmaktadır. İki ekstrasellüler proteaz, jelatini, kazeini, ve immünoglobulinleri parçalarlar. Akciğerlerde bulunan proteinin %30' unu oluşturan elastin, akciğerlerin genişleyip daralmasını olanak vermektedir (Hamood et al., 1996). Elastaz, fibronektini parçalayarak, akciğer mukozasında bakterilerin yapışması için gerekli olan reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar (Todar K., 2008; Ünal, 2002). Elastazın etkileri virülans ile doğrudan ilişkilidir. Las B elastaz ve Las A proteaz, elastolitik aktiviteden birlikte sorumludur. Elastolitik aktivite sonucunda elastin içeren insan akciğer dokusu hasara uğrar ve *P.aeruginosa* enfeksiyonunun yayılımı ile pulmoner hemorajiye neden olur. Las B elastaz bir çinko metalloproteazıdır ve elastin içeren bazı proteinler üzerinde etkilidir. Las A proteaz ise bir serin metalloproteazıdır ve elastinin parçalanmasında Las B ile sinerjistik bir etki gösterir. Las B elastazın proteolitik aktivitesi alkali proteazın yaklaşık 10 misli kadardır (Galloway,1991; Van Delden and Iglewski, 1998). Las B elastaz sadece elastini değil bunun yanında fibrini ve kollajeni de parçalar. Las B elastaz insan immunoglobulin A ve G' yi, solunum yolu lizozimini, kompleman sistemi komponentlerini, bronşiyal mukus proteinaz inhibitörlerini ve solunum yolunda proteazlara karşı koruyucu bazı maddeleri inaktive edebilmektedir (Heck et al,1986; Van Delden and Iglewski, 1998). Las A ve Las B genlerinin ifadesi, *P.aeruginosa'daki* regülatör sisteminde iki otoindükleyici olan lasR ve rhIR' nin kontrolü altındadır (Coin et al,1997).

Alkali proteaz, 49 kDa ağırlığında bir metalloproteaz olan enzim, apr geni tarafından kodlanmaktadır. Akut akciğer hasarının erken dönemlerinde alveoller içinde oluşmuş yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesiyle enfeksiyonun

ilerlemesine yol açar. Özellikle kornea enfeksiyonlarının patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

Proteaz IV., *P.aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patogeneizde rol alır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, proteaz IV' ün akciğerlerdeki sürfaktan proteinleri parçalayarak akciğerlerin fonksiyonunu bozduğu ve böylece akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir (Malloy et al, 2005).

- **Hemolizinler**

*P. aeruginosa* virülansına katkıda bulunan iki hemolitik toksin üretir. Hemolizinlerden bir tanesi ısıya dirençli olan ramnolipid ve diğeri ısıya duyarlı olan fosfolipaz C' dir (Berka and Vasıl, 1982). Her ikisi de lipidlerin ve lektinin yıkılmasında sinerjistik etki gösterirler. Ramnolipid, yapısında ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri yapısından dolayı akciğer sürfaktanındaki fosfolipidleri çözünür hale getirerek fosfolipaz C' nin etki etmesine yardımcı olur (Van Delden and Iglewski, 1998). Ramnolipid aynı zamanda siliyer aktivitenin azalmasına ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının oluşmasından sorumludur (Yücesoy Dede, 2006). *P.aeruginosa* biri hemolitik diğeri nonhemolitik olmak üzere 2 farklı fosfolipaz C üretir. Nonhemolitik fosfolipaz C (PLC-N) patojenik aktivite göstermemesine karşın, hemolitik fosfolipaz C (PLC-H) yüksek dozlarda fareye uygulandığında vasküler geçirgenliğin artmasına, doku hasarına ve ölüme neden olur. Bundan dolayı *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında hemolitik fosfolipaz C önemli bir virülans faktörü olarak rol oynar (Wieland et al., 2002).

- **Piyosiyenin**

Koloniye mavi-yeşil renk veren ve bir fenazin türevi olan piyosiyenin pigmenti bakterinin virülansına katkıda bulunan en önemli faktörlerinden biridir. Piyosiyenin pigmentinin bakteri hücrelerinde, karaciğer hücrelerinde ve insan epitel hücrelerinde redoks döngüsüne etki ettiği gösterilmiştir (Kanthakumar et al.,1993). Elektronları doğrudan NAD ve NADH moleküllerinden alır ve aerobik koşullarda bu elektronları reaktif oksijene aktararak, superoksit ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna yol açar. Hücre içinde oluşturduğu oksidan



radikallerinin artışı çeşitli hücrelerde patofizyolojik etkilere neden olur. Kistik fibrozisli hastaların akciğerinde oldukça fazla hücresel hasara neden olur. Hücresel solunumu bozar ve siliyer fonksiyonları inhibe eder ve bu inhibisyon ATP ve cAMP' nin hücresel seviyelerinin azalması ile ilişkilidir (Denning et al.,1998). Bunlara ilave olarak piyosiyanın epidermis çoğalmasını durdurduğu, kalsiyum homeostazını bozduğu bilinmektedir. Ayrıca  $\alpha$ 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur (Denning et al., 2003).

- **Piyoverdin**

Piyoverdin çevreden demir bağlayan küçük bir molekül olarak *P. aeruginosa*' nın metabolizmasında kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar *P.aeruginosa*' nın ekzotoksin A (ekzo A) ve endoproteaz gibi diğer virülans faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol aldığı ve önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (Lamont et al., 2002).

- **Sitotoksin**

Sitotoksin, 25.000 mol ağırlığında bir proteindir. Lökositlere zarar verici etkisi nedeniyle lökosidin olarak da adlandırılır. Hücre membranına etki ederek nörofillerin ve lökositlerin yapısını bozar. Ayrıca akut akciğer hasarının patogeneğinde rol oynar (Wilson and Sande, 2004).

#### **2.1.4.3. *P. aeruginosa* Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa* yüzeysel deri enfeksiyonlarından sepsise kadar farklı klinik tablolara sebep olabilen, yüksek morbidite ve mortalitesi ile önemli bir insan patojenidir. Özellikle hastane ortamında, bağışıklık ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilir.

*P. aeruginosa*'nın en sık neden olduğu enfeksiyonlar, nötropenik hastalarda, mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda ve kistik fibrozlu hastaların akut alevlenmelerinde görülen pnömoniler, nötropenik hastalar ve HIV enfeksiyonunu içeren bağışıklığı kırılmış hastalardaki bakteriyemiler, yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonları, diyabetik hastalarda ve yüzücülerin kulağında gelişen malign

otitis media, santral sinir sistemi enfeksiyonları, kontakt lensler ile endoftalmit ve keratit, idrar yolu enfeksiyonları, ortopedik enfeksiyonlar, intravenöz ilaç kullananlarda doğal kapak endokarditi ve prostetik kapak endokarditi olarak sayılabilir (Işık, 2008).

### ➤ Akciğer enfeksiyonları

*P. aeruginosa*, immün sistemi baskılanmış hastalarda akut, hayatı tehdit eden, bakteriyemik ve nonbakteriyemik pnömoniye bununla beraber kistik fibrozisli hastalarda kronik alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. Pnömoni genellikle hastane kökenli olup yoğun bakımda yatan hastalarda görülür ve bu hastalarda bakteri üst solunum yoluna kolonize olur (Ohl and Matthew, 2004).

Geçmişte antibiyotik kullanımı, ventilatör veya respiratuar inhalasyon tedavisi, altta yatan akciğer hastalığı ve kalp yetmezliği, alt solunum yolu enfeksiyonuna zemin hazırlar. Bu hastaların üst solunum yoluna kolonize olan bakteri, aspirasyonla alt solunum yoluna yayılır ve bu nedenle böyle hastalarda pnömoni gelişmesi beklenen bir durumdur. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu nozokomiyal pnömonilerde mortalite oranları oldukça yüksektir (Bukholm et al., 2002).

Bakteriyemi ile birlikte gelişen *P. aeruginosa* pnömonisi özellikle nütropenik hastalarda meydana gelir ki bu durumda hastalık alt solunum sisteminde gelişir ve metastatik yayılımlar gösterir. Her iki akciğerde küçük, nodüler, hemorajik, bazen nekrotik olan yaygın lezyonlar görülür (Ohl and Matthew, 2004).

Kistik fibrozis en sık görülen öldürücü karakterdeki kalıtsal hastalıktır. *P. aeruginosa*, kistik fibrozisli hastalarda her yaş gurubunda en sık görülen fırsatçı bir patojendir (Campana et al., 2004).

Kistik fibrosizli hastaların solunum yollarına ilk kolonizasyon nonmukoid *Pseudomonas aeruginosa* suşlarıyla başlar ancak bazı çevresel koşulların baskısı altında bu suşlar mukoid fenotipe dönüşerek akciğer enfeksiyonlarında dominant hale geçmektedirler. Nonmukoid suşun mukoid şekle dönüşebilmesi için bakteride mukoid ekzopolisakkarid yani aljinat sentezinin uyarılması gerekmektedir (McAvoy et al., 1998). Aljinat üreten suşlar biyofilm oluşturarak bakterinin antibiyotiklerden ve ilaçlardan korunması için iyi bir ortam sağlar aynı zamanda bakteriyi

fagositozdan korur. İnsanlarda alginat üreten *P. aeruginosa* suşları kistik fibrozisli hastaların pulmoner yollarında kolonize olur ve akciğer hava yollarını kapatarak hastaların ölümlerine sebep olurlar. Oluşan mukoid suşların yardımı ile uzun süre akciğerlerde varlığını sürdüren *P. aeruginosa* suşları, dokuların farklı şekilde hasara uğramasına neden olurlar. Birinci hasar bakterinin ortama saldığı virülans faktörlerinden kaynaklanmaktadır. İkincisi ise kronik enfeksiyonlara karşı oluşan immun cevabın doku hasarına neden olmasından dolayıdır (Stapper et al., 2004).

*P.aeruginosa*'nın mukoid suşları kistik fibrozlu hastalarda bir yaşın altında %21 oranında, 26 yaşın üzerinde ise %80' e kadar yaşla birlikte artan oranda alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olur (Bilgehan,1995; Vahaboğlu ve Akhan, 2002 ; Baron and Finegold, 1990).

### ➤ **Bakteriyemi**

Hastane kaynaklı bakteriyemilerin en sık nedenlerinden birisi *P. aeruginosa*' dır. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, mortalitesi yüksek enfeksiyonlar olan *P.aeruginosa* bakteriyemileri, oldukça tehlikeli ve önemlidir. *P.aeruginosa* bakteriyemilerinde hastanın yaşı ve enfeksiyonla ilişkili diğer faktörlere bağlı olmak üzere mortalite oranları %20-70 arasındadır. Yapılan bir çalışmada, nozokomiyal *P. aeruginosa* bakteriyemilerinde mortalite oranı %36 olarak saptanmıştır (Akalın, 2007). Ancak toplum kökenli *P. aeruginosa* bakteriyemisi oldukça nadir görölmektedir (Wilson and Sande, 2004).

Bakteriyemi primer veya sekonder olarak oluşabilir. Primer bakteriyemi özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ortaya çıkmaktadır. Primer bakteriyemi kaynağı, kontamine aletler veya tedavi amaçlı kullanılan solüsyonlardır. Sekonder bakteriyemi enfeksiyonlarının çoğu solunum sistemi, üriner sistem, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıyla (özellikle yanıklı hastalarda) ilgilidir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

### ➤ **Septisemi**

Septisemi, AIDS ve kanser hastası gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ve yenidoğanlarda, yara ve yanık enfeksiyonları gibi lokal enfeksiyonlar ile ortaya çıkmaktadır. Kapiller damarlardaki *P. aeruginosa*' nın deriye lokalize olması

sonucunda vezikül, bül ve sonunda ektima gangrenozum adında hemorajik ve nekrotik yaralar şeklinde gelişen döküntüler görülür. *P. aeruginosa* sepsislerinde ölüm oranı çok yüksektir (Bilgehan, 1995 ; Baron and Finegold, 1990)

#### ➤ **Endokardit**

*P. aeruginosa*' ya bağlı endokardit, protez kalp kapağı bulunan kişilerde kalp kapağına, ilaç bağımlılığı olan kişilerde ise doğal kalp kapağına yerleşerek meydana gelir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002 ; Baron and Finegold, 1990).

Bölgesel farklılıklar göstermekle beraber ilaca bağımlı kişilerde Gram negatif bakterilere bağlı endokarditin % 58 kadarında *P. aeruginosa*' nın etken olduğu saptanmıştır. *P.aeruginosa*' ya bağlı gelişen endokardit olgularında ise % 90' dan fazlasının intravenöz ilaç kullandığı saptanmıştır (Pollack, 2002).

#### ➤ **Kulak Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa* normal kulakta nadiren bulunmasına rağmen yaralanma, inflamasyon ve nem gibi durumlarda dış kulak yoluna sıklıkla yerleşebilir, böylece iyi seyirli akut enfeksiyonlara ya da malign eksternal otit gibi ciddi kronik enfeksiyonlara neden olabilir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002). Dış kulak iltihabı çoğunlukla yüzücülerde görülen bir enfeksiyondur ve lokal antibiyotik yada kurutucu ilaç kullanımı ile tedavi edilebilir. Malign dış kulak yolu iltihabı ise diyabetli ve yaşlı kişilerde görülür. Alttaki dokulara saldırarak kranial sinirlere ve kemiğe hasar verir ve yaşamı tehdit eder. Bu durumda yoğun antibiyotik tedavisi yada cerrahi bir müdahale gerekebilir. Bununla beraber kronik orta kulak enfeksiyonlarında da *P. aeruginosa* en sık izole edilen bakterilerden biridir (Murray et al., 2002).

#### ➤ **Üriner Sistem Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*' nın etkeni olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının çoğu hastane kaynaklıdır. Hastane ortamında bu duruma zemin hazırlayan en büyük etmenler, üriner sistem kateterizasyonu, üriner sistem girişimleri ve böbrek transplantasyonunu içeren cerrahi girişimlerdir. Kronik prostatit, üriner sistem taş hastalıkları ve üriner sistemde tıkanma yapan diğer hastalıklar tekrarlayan üriner

sistem enfeksiyonlarına yol açar ki bu durum *P. aeruginosa* enfeksiyonu için önemli bir risktir (Ohl and Matthew, 2004; Yardy and Cox, 2001).

#### ➤ **Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa* bakteriyemisi sırasında tipik olarak ektima gangrenosum denilen deri lezyonları gelişebildiği gibi aynı zamanda derialtı nodülleri, derin abseler, sellülit, veziküler veya püstüler lezyonlar, büller de görülebilir. *P. aeruginosa*'ya bağlı deri enfeksiyonları lokal veya yaygın olabilir. Bu hastalığa yatkınlık yaratan durumlar yanık, travma ve dermatitlerdir. Çeşitli yollarla bulaşan bakteriler yara ve yanıklarda lokal ve çoğu kez mavi yeşil renkte irin şeklinde görülen enfeksiyonlara neden olur. Ağır yanık durumlarında deride hakim olan gram pozitif flora yerini gram negatif basillere ve özellikle *P.aeruginosa*'ya bırakır. Böylece yanık bölgesinde kolonize olan *P.aeruginosa* dokunun bir gramında  $10^5$  bakteri konsantrasyonuna ulaşır ve çeşitli yollarla kana geçer. Böyle hastalarda tedavisinde ki tüm gelişmelere rağmen mortalite %78 gibi çok yüksek bir orandadır (Bilgehan, 1995 ; Baron and Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

#### ➤ **Göz Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*'ya bağlı göz enfeksiyonları, kontamine kozmetik ürünler, kontakt lens ve lens solüsyonlarının kullanımı yada göz yüzeyinde çizik gibi korneada meydana gelen travmalar sonucu gelişir. Gerekli tedavinin yapılmaması durumunda kornea ülserleri gelişir ve böylece yaşamsal tehlike görülür (Murray et al., 2002). Keratit, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu en sık rastlanılan göz enfeksiyonlarından biridir. Kontakt lensle ilgili *P. aeruginosa* keratiti genellikle uygunsuz dezenfeksiyon, hijyen olmayan lenslerin kullanımlarında görülür. *P. aeruginosa* kaynaklı endoftalmit ise çoğunlukla endojen kaynaklıdır. Travma, yanık veya oküler cerrahi sonrası *P.aeruginosa*'nın gözün iç kısmına yerleşiminden dolayı meydana gelir (Üstün, 2007).

#### ➤ **Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları**

*P.aeruginosa* orofarinksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde kolonizasyon yapabilir ve en sık yenidoğanlarda, kemoterapi gören nötropenik hastalarda ve hematolojik malinitesi olanlarda ve ortaya çıkar. *Pseudomonas*

sepsisi için gastrointestinal sistem önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (Baron and Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

#### ➤ **Kemik ve Eklem Enfeksiyonları**

Enfeksiyon doğrudan kemik ve eklemlerde başlar veya kan yoluyla yayılım olur. Ayrıca delici travma, cerrahi uygulamalar ve yumuşak doku enfeksiyonları sonucunda da *P.aeruginosa*'nın neden olduğu kemik ve eklem enfeksiyonları gelişebilmektedir (Bilgehan, 2004; Turan, 2007).

#### ➤ **Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

*P.aeruginosa*' ya bağlı merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının gelişmesi; kulak ve paranazal sinüsteki enfeksiyonun yayılması, kafa travması sonucunda yada üriner sistem, akciğer ve endokardit gibi uzak bir enfeksiyonun merkezinden bakteriyemik yayılım şeklinde görülür. Böylece merkezi sinir sisteminde *P.aeruginosa*' ya bağlı menenjit ve beyin abseleri görülür. *Pseudomonas aeruginosa*, kanser hastalarında *Listeria monocitogenes*' den sonra ikinci sıklıkla menenjit etkeni ve *E.coli*' den sonra ikinci sıklıkta, beyin apsisi etkeni olarak bulunmuştur (Vahaboğlu ve Akhan, 2002; Pollack, 2002).

*P. aeruginosa*' nın neden olduğu birçok enfeksiyonun dışında, özellikle AIDS' li hastaların ileri evrelerinde giderek artan bir enfeksiyon nedeni olmuştur. AIDS' li hastalarda bakteriyemik ve bakteriyemik olmayan *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına neden olmakta ve gelişen bu enfeksiyonlar fırsatçı özellikte olmaktadır. Bakteriyemik enfeksiyonlar; enfekte santral venöz kateter, alt solunum yolu enfeksiyonları , deri yumuşak doku enfeksiyonlar ve üriner sistem enfeksiyonlar ile bakteriyemik olmayan enfeksiyonlar ise çoğunlukla pnömoni, sinüzit ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkilidir. AIDS hastalarında hem bakteriyemik hem de bakteriyemik olmayan enfeksiyonlar yaşamı tehdit ederek ölümcül olabilir. AIDS ile ilişkili *P. aeruginosa* enfeksiyonları uzun süre tedavi edilmesine rağmen tekrarlama eğilimindedir ve enfeksiyonların çoğu kronikleşir (Pollack, 2002).

### 2.1.5. Quorum Sensing

Bakteriler iletişim sinyalleri ile buldukları yerdeki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler ki bu davranış, çoğunluğu algılama (“quorum sensing”) olarak adlandırılmaktadır (Dong and Zhang, 2005; Joint et al., 2007; Williams et al., 2007). Bakteri popülasyonu belirli bir yoğunluğa ulaştığında otoindükleyici olarak işlev gören bazı özel sinyal molekülleri, bakterinin metabolizmasında bir takım değişikliklere neden olmakta ve bazı genlerin ekspresyonu meydana gelmektedir (Hentzer and Givskov, 2003).

*P.aeruginosa*’da birbiri ile ilişkili las ve rhl olarak tanımlanan iki QS sistemi bulunmaktadır (Albus et al., 1997). ‘las sistemi’ olarak adlandırılan birinci sistem, Las I ve Las R genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu, Las B elastaz, Las A proteaz ve ekzotoksin A gibi ekstrasellüler virülans faktörlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder. *rhl* olarak adlandırılan ikinci sistem *rhl* I ve *rhl* R’den oluşur. Bu sistemin, rhamnolipid üretimi için gerekli olan “rhamnosyltransferase” enziminin sentezlemesini düzenlemesinin yanısıra, Las B elastaz, Las A proteaz, piyosyanin, siyanid ve alkalin proteazın üretimini de düzenlediği bilinmektedir (Köhler et al., 2007; Sandoz et al., 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* tarafından salınan lakton ve diğer sinyal molekülleri aracılığıyla, bakteri bakteriyel popülasyon, çevresini algılama, iletişim ve kendi yoğunluğunu ayırt etme özelliğine sahiptir. Bu düzenleyici sistem hücre yoğunluğuna bağlı biçimde koordine olarak, *P. aeruginosa*’nın hücre dışı virülans faktörlerini üretmesine imkan sağlarken aynı zamanda da konağın immun yanıtını da etkileyerek daha invaziv enfeksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Hooi et al., 2004). Bakteri hücrelerinde virülans genlerinin ifadesinin engellenmesi ve bu sayede bakteri virülansının azaltılması ile enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir adım olabileceği kabul edilmektedir (Hentzer and Givskov, 2003).

### 2.1.6. *P.aeruginosa*’nın Epidemiyolojisi

*P.aeruginosa* ilk kez 1960’lı yıllarda immün sistemi baskılanmış hastalarda, yanıklı hastalarda ve kistik fibrozisli hastalarda enfeksiyona yol açması nedeniyle önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmiş, günümüzde de akciğer, kan ve

üriner sistem kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip olması bu bakterinin önemini daha da arttırmaktadır (Wilmoth et al., 2001).

Özellikle nemli ortamlarda kolaylıkla üreyebilen *P. aeruginosa* çoğunlukla toprak, su ve organik maddeler gibi kısıtlı besin maddeleri bulunan ortamlarda yaşayabilen fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır. Hastane ortamlarındaki solunum cihazları, endoskoplar, enfüzyon cihazları, damar içi kataterler, lavobalar, duşlar, paspaslar, temizlik solüsyonları, dezenfektanlar, küvetler, ilaçlar ve çiçekler olası enfeksiyon kaynaklarıdır (Wilson and Sande, 2004). İnsanlarda da ise koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşir. İnsana *P. aeruginosa*, yüzme havuzu, jakuzi, sauna ve kontak lens solüsyonları gibi hastane dışında su ile ilgili kaynaklardan da bulaşabilir (Bilgehan, 2004; Turan, 2007).

İnsanların normal florasında da bulunabileceği gibi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının çoğu hastaneden kazanılır. Hastane dışındaki veya hastaneye başvuran kişilerde düşük oranda bulunur. Deride % 0-2, burun mukozasında %0-3, boğazda % 0-6, dışkıda % 2.6-24 arasında bulunur. Yoğun bakım üniteleri, yanık üniteleri, mekanik ventilatörler, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invaziv enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır (Stephen et al., 2006).

## **2.2. Hastane Enfeksiyonları**

Hastane enfeksiyonları; hasta hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan sonra 10 gün içerisinde gelişen enfeksiyonlardır. *P. aeruginosa* insanlarda oluşturdukları enfeksiyonların sıklığı ve çeşitliliği ile önemli mortalite ve morbidite oranları ile önemli bir nozokomiyal patojen olarak bilinmektedir. Özellikle immun sistemi baskılanmış ya da beslenme yetersizliğinin olduğu durumlarda hastalıklara neden olan fırsatçı patojen olup, özellikle hastane araç gereçleri veya hastane personelinin ellerinden kaynaklanan nozokomiyal salgınlara da neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonları arasında da etken olarak giderek daha yüksek oranlarda saptanmaktadır. Hastane ortamında bakterilerin kolay barınabilmesi ve direnç geliştirebilmesi sebebiyle de tedavilerinde zorluklar yaşanmaktadır



(Kurtoğlu vd., 2008). Hastane infeksiyonlarının %10-25' inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (Gül vd., 2004 ; Günseren vd., 1999).

Hastane ortamında sık antibiyotik kullanımı da çoklu dirence sahip *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıkmasını kolaylaştırmaktadır. Bununla beraber *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiğe karşı bakterinin hızla direnç kazanmasıyla tek ilaçla tedavide başarı oranı gittikçe azalmaktadır. Bunun için ya kombine tedavi yada beta laktamaz inhibitörlü kombinasyonlarının kullanımı önerilmektedir (Karadenizli vd., 2002)

Nemli ortamlarda yaşamayı seven bir mikroorganizma olmasından dolayı *P. aeruginosa*, özellikle yoğun bakım hastaları arasında sık rastlanan nozokomiyal bir patojendir. Ayrıca hastaneye yatan kişiler bir hafta gibi kısa bir sürede hastane florası ile kolonize olurlar (Öztaş vd., 2007).

1992-1997 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri' nde bulunan Ulusal Hastane infeksiyonlarını İzleme Servisi (NNIS) verilerine göre *P.aeruginosa* bakteriyemi olgularının %3' ünden, pnömonilerin %21' inden ( en sık izole edilen etken), üriner sistem enfeksiyonlarının %10'undan (en sık izole edilen 4. etken), göz, kulak, burun, boğaz enfeksiyonlarının %13' ünden (en sık izole edilen 3. etken) ve kardiovasküler enfeksiyonların %5' inden izole edilmektedir (Richards et al., 1999).

### **2.3. Antibiyotiklerin Genel Özellikleri**

Antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılması 17. yüzyıla dayanır. Ancak modern kemoterapinin temelleri ise 20. yüzyılda Paul Ehrlich tarafından atılmıştır. Ehrlich antimikrobiyal maddelerin klinik uygulamada seçici toksisite göstermemesini yani, mikroorganizmaya zarar verip, insana zarar vermemesi gerektiğini belirtmiştir. Hastalık nedeni olan mikroorganizmaları konağa zarar vermeden ortadan kaldıran, ilaçlarla yapılan tedavi şekline kemoterapi denir. Antimikrobik maddeler, etkiledikleri patojenin cinsine göre antibakteriyel, antimikotik, antivirütik, antiparaziter ilaçlar olarak adlandırılırlar (Akşit vd.,1996).

Antibiyotikler, bakteriler ve funguslar gibi çeşitli mikroorganizma türleri tarafından sentezlenen ve düşük konsantrasyonlarda diğer mikroorganizmaların gelişmesini önleyen ya da bu mikroorganizmaları öldüren kimyasal maddelerdir. Antimikrobiyal

ajanlar kimyasal yapılarına ve mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine göre de farklılık gösterir. Bakteriyostatik etkili antibiyotikler bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini engellerken, penisilin antibiyotiği gibi bakterisid etkisi olanlar bakteri hücrelerini yok ederler (Cingi ve Erol,1996).

Her ne kadar sadece mikroorganizmaların ürettiklerine antibiyotik tanımı verilsede, bugün antibiyotik terimi patojenlere zarar veren her türlü kimyasal madde için kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüzden, mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler tarafından doğal olarak üretilen bu tür kimyasallara antibiyotik olarak bilinmektedir. Aynı zamanda, doğal olarak üretilen birçok antibiyotik madde suni yollardan daha etkili olmaları için modifiye edilmektedir. Örneğin, doğal olarak üretilen penisilinler bugün kimyasal olarak modifiye edilerek daha etkili olmaları sağlanır. Eskiden tamamiyle doğal yollardan elde edile kloramfenikol antibiyotiği de bugün tamamiyle sentetiktir (Vikipedi, 2010).

### **2.3.1. *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler**

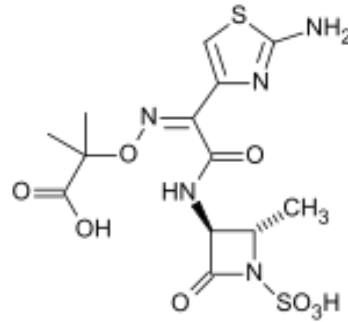
*P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem ve meropenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktamlar; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklinminosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır. Ancak beta-laktam antibiyotiklerin tedavideki yaygın kullanımları, yeni direnç mekanizmalarının gelişmesine, ve bu oranın giderek artmasına neden olmaktadır (Bilgehan, 2004; Baron and Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

Günümüzde pek çok farklı mekanizmalar ile etki ederek bir mikroorganizmanın üreyip çoğalmasını engelleyebilen ya da ölümüne neden olan çok sayıda antimikrobiyal ilaç kullanılmaktadır. Antibiyotikler etkilerini, bakteri hücre duvarının yapımını, bazıları hücre zarının yapımını veya zarın fonksiyonlarını engelleyerek gösterebilirler. Protein sentezinin yapı taşları olan ribozomları veya mikroorganizmaların nükleik asitlerini hedef alan antibiyotiklerde bulunmaktadır (Çolak,1999).

### 2.3.2. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler ve Özellikleri

Çalışmamızda Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sülfametoksazol, Tetrasiklin antibiyotikleri kullanılarak antibiyotikleme gerçekleştirildi.

Aztreonam, beta-laktam antibiyotik gruplarından biri olan monobaktam grubunda yer alır. Yapısındaki beta laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta-laktamlardan ayrılır (Şekil 2.1). Bu antibiyotik *Enterobacteriaceae* familyası ve *Pseudomonas* gibi pek çok Gram negatif basile etkiliyken Gram pozitif ve anaerobik bakterilere karşı etkisizdir. Gram negatif bakterilerde, PBP3' e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder. Dar spektrumundan dolayı polimikrobiyal enfeksiyonlarda tek başına kullanılmamalıdır. Ancak üriner sistem enfeksiyonlarında aminoglikozitlerin alternatifi olarak düşünülebilir (Tünger vd, 2005).

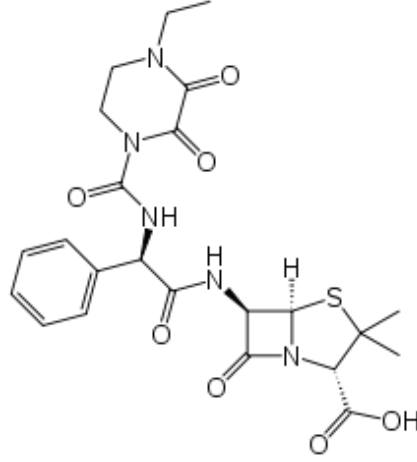


Şekil 2.1. Aztreonamın moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

#### 2.3.2.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler

Piperasilin beta laktam grubunun önemli bir kısmını oluşturan penisilinler grubunda yer alır (Şekil 2.2). Tıp alanında kullanılan en eski antibiyotikler olan penisilinler bakterisid aktiviteye sahiptir. Bu antibiyotikler tüm vücuda dağılım gösteren iyi farmakokinetik özellikleri olması, toksisitelerinin az olması, ucuz olması ve duyarlı olan bakteriyel enfeksiyonlarda etkin sonuçlar oluşturması gibi özelliklerinden dolayı pek çok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Penisilin grubu antibiyotikler, bakterinin hücre duvar sentezinde transpeptidasyon aşamasında görevli olan ve transpeptidaz aktivitesi gösteren penisilin bağlayan protein (PBP)' lere bağlanarak bunları inaktive ederler. Böylece bakterilerin peptidoglikan tabakalarına sağlam peptidoglikan monomerlerinin eklenmesini

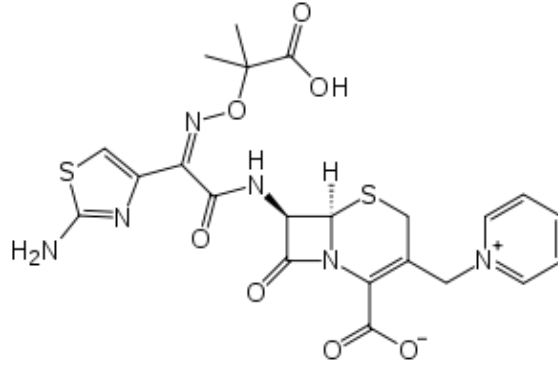
engelleyerek duvar bütünlüğü bozulur ve bakterinin dış ortama karşı direncinin kaybına yol açar. Ayrıca stoplazma zarının parçalanmasına ve hücrenin ölmesine neden olur (Öncül, 2002).



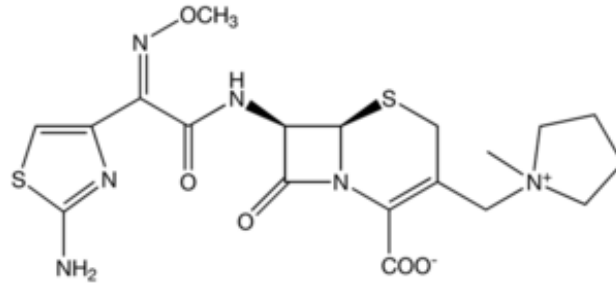
Şekil 2.2. Piperasilinin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

### 2.3.2.2. Sefalosporinler

Seftazidim 3. kuşak ve Sefepim 4. kuşak Sefalosporinler grubunda yer alır (Şekil 2.3; Şekil 2.4). Sefalosporinler ilk kez bir fungus olan *Cephalosporium acremonium*' un fermentasyon ürünlerinden 1945 yılında elde edilmişlerdir. bu antibiyotikler etki spektrumları dikkate alınarak 1., 2., 3. ve 4. kuşak sefalosporinler olmak üzere 4 kuşağa ayrılırlar. Birinci kuşakta sefadroksil, sefazolin, sefaleksim, sefaloridin, sefalotin, sefapirin ve sefradin; ikinci kuşakta sefaklor, sefamandol, sefonisid, seforonid, sefprozil, sefuroksim, sefotetan, sefmetazol, sefoksitin ve sefaklorun karbasefem analogu olan lorakarbef; üçüncü kuşakta sefiksim, sefoperazon, sefotaksim, sefpodoksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson; dördüncü kuşakta ise sefepim ve sefpirom yer almaktadır (Tünger vd., 2005). Penisilinler gibi bakteri hücre duvarının sentezini bozarak bakterisid etki yaparlar ayrıca beta-laktam halkası taşırlar, 7-aminosefalosporanik asid türevidirler. Genellikle üçüncü kuşak sefalosporinler *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına etkilidirler (Cingi ve Erol, 1996).



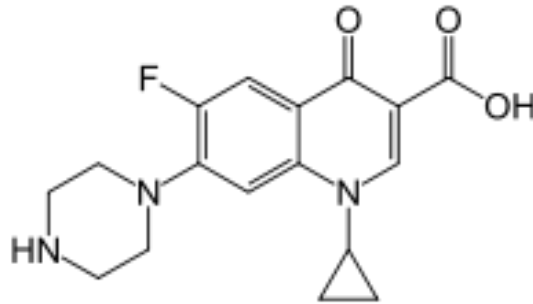
Şekil 2.3. Seftazidimin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).



Şekil 2.4. Sefepimin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

### 2.3.2.3. Kinolonlar

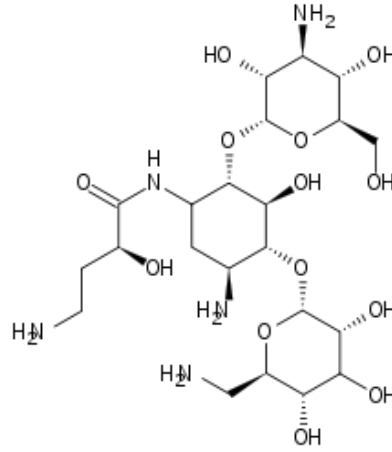
Siprofloksasin, üçüncü kuşak kinolonlar (fluorokinolonlar) grubunda yer alır (Şekil 2.5). Kinolonlar sentez yoluyla elde edilen kinolein türevi antibiyotiklerdir ve bu grubun ilk üyesi nalidiksik asittir. Kinolonlar DNA-giraz enzimini inhibe ederek bakterisid etki gösterirler. Böylece bakteriler bölünemez ve anormal şekilde uzayıp ölürler. Siprofloksasininde içinde bulunduğu fluorokinolonların daha güçlü antibakteriyel etki göstermesi ve bu gruba karşı direnç gelişimlerinin daha seyrek olmasından dolayı diğer kinolonlara üstünlükleri vardır (Dökmeci, 2000)



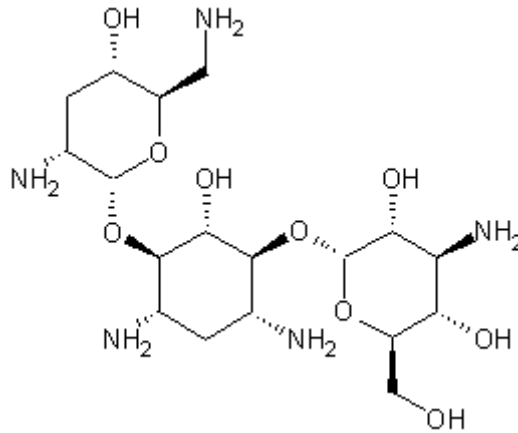
Şekil 2.5. Siprofloksasinin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

### 2.3.2.4. Aminoglikozidler

Amikasin ve Tobramisin aminoglikozidler grubunda yer alırlar (Şekil 2.6; Şekil 2.7). Tobramisin doğal olarak elde edilirken amikasin semisentetik bir antibiyotiktir. Aminoglikozidler grubundaki antibiyotikler polar özellikteki antimikrobiyal ilaçlardır (Dökmeci, 2000). Aminoglikozidler, 1940' lı yıllardan beri kullanılan ve bazı yan etkilerine rağmen, klinik kullanımda önemini hiçbir zaman kaybetmemiş nadir antibiyotik gruplarından biri olarak kabul edilir. Tedavi sırasında bu antibiyotiklere karşı diğer antibiyotiklere göre daha yavaş direnç gelişimi önemli bir avantajdır. Bu antibiyotiklerin etki mekanizması olarak, bakteri ribozomlarının 30S alt ünitesine geri dönüşümsüz bağlanarak kodonda değişikliğe neden olarak, mRNA' daki genetik bilginin yanlış okunmasına yol açar. Böylece bakteri ribozomundaki protein sentezi inhibe olur ve bakterisid etkisi ortaya çıkar (Yamazhan, 2007).



Şekil 2.6. Amikasinin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).



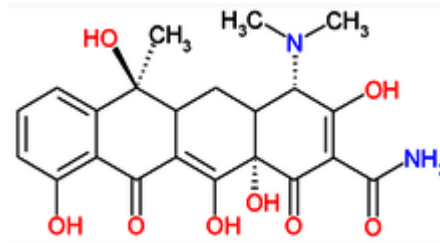
Şekil 2.7. Tobramisinin moleküler yapısı (Ganfyd, 2010).

Trimetoprim/Sulfametoksazol, kombinasyonu kotrimoksazol olarak da bilinir. Diaminoprimidinler grubunda yer alan trimetoprim, mikroorganizmaların dihidrofolat redüktaz enzimini spesifik olarak inhibe ederek, folinik asit sentezini bloke eder. Ancak sülfonamidlerin kombinasyonu ile iki basamaklı bir inhibitör etki sağlanarak bu sentez engellenir, böylece bakteride DNA ve RNA sentezi engellenmiş olur. İki antibakteriyel ilacın sinerjistik etkinliği ile rezistans gelişmesinin daha seyrek görülmesi ile kombinasyonla üstünlük sağlanır (Dökmeci, 2000).

Sülfametoksazol ise sülfonamidler grubunda yer alır. Kimyasal yapıları PABA' ya benzer. Duyarlı bakterilerde folik asit sentezi için p-aminobenzoik asidin (PABA'nın) pteridin ile dihidropteroat sentetaz enzimi eşliğinde birleşmesi gerekir ancak sülfonamidler bu enzimi inhibe ederler. Sonuçta purin bazlarının sentezi yapılamaz ve bakterilerde DNA ve RNA sentezleri bozulur (Cingi ve Erol,1996).

### 2.3.2.5. Tetrasiklinler

Tetrasiklin, tetrasiklinler grubunda yer alır ve doğal yoldan elde edilen antibiyotiklerdir (Şekil 2.8). Kimyasal yapılarında dört halka bulunan, en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (Usluer, 2007). Tetrasiklinler farmakokinetik özelliklerine göre, 1. ve 2. kuşak tetrasiklinler olmak üzere iki grup altında incelenir. Tetrasiklinler, bakteri hücresi ribozomlarının 30 S alt ünitelerine geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanarak, protein sentezini inhibe eder ve böylece bakteriyostatik bir etki meydana gelmiş olur. Tedavide kullanılan antibiyotikler içerisinde tetrasiklinler en geniş spektrumlu olanıdır. Tetrasiklinler birçok mikroorganizmanın neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmasına karşın, *P. aeruginosa* tetrasiklinlere dirençlidir. Ancak doksisisiklin ve minosiklin gibi 2. kuşak tetrasiklinlere olan direnci daha azdır (Dökmeci, 2000).



Şekil 2.8. Tetrasiklinin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

Meropenem ve imipenem karbapenem grubunda yer alır. Çalışmamızda karbapenemlere karşı kazanılan direnç fenotipik ve genotipik açıdan değerlendirildiğinden, karbapenemler grubu daha ayrıntılı incelenmiştir.

### 2.3.2.6. Karbapenemler

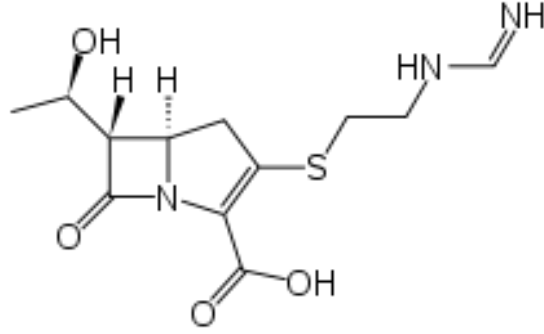
İlk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından doğal olarak üretildiği saptanmış ve tiamisin adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiş ilk karbapenem antibiyotiği tienamisinidir. Meropenem ve imipenem tienamisin antibiyotiğinin sentetik türevleridir. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktamlardan ayrılır. Bu yapı karbapenemlerin bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırarak, antibiyotiğin etki spektrumunu genişletir ve antibakteriyel gücünü artırır (Bonfiglio et al., 2002). Penisilinlerden ve sefalosporinlerden farklı olarak 6-hidroksietil zincirinde C5 ve C6' daki hidrojen atomları birbirlerine trans konfigürasyondadır. Bu konfigürasyonun, karbapenemlerin çok çeşitli beta-laktamazların yıkıcı etkilerine karşı stabilitesini koruyabilmesi için avantaj sağladığı düşünülür. Bu stabilite sayesinde de karbapenemler Gram negatif bakterilere karşı yüksek etkinlik göstermektedir (Craig, 1997).

Karbapenemler, günümüzde kullanılmakta olan antibiyotikler arasında bilinen en etkin ve geniş spektrumlu antibiyotik sınıfıdır. Etki spektrumları; ciddi infeksiyon etkeni olan *Enterobacteriaceae* , anaeroplara, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*' yi kapsamaktadır ve bu infeksiyonların tedavisinde önemli sorun olan, GSBL ve kromozomal AmpC tipi beta-laktamaz enzimlerine dirençlidirler. Ancak sınıf B metallo-beta-laktamazlar dahil, karbapenemazlar bu antibiyotikleri hidroliz edebilmektedir. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır infeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça önemlidir. Yirmi yılı aşkın süredir klinik kullanımda olan bu grubun üyelerinden, imipenem, meropenem ve ertapenem ülkemizde kullanımdadır (Bonfiglio et al., 2002; Şenol, 2009).

İmipenemin Gram-pozitif, Gram-negatif, aerob ve anaerob mikroorganizmaları içine alan çok geniş etki spektrumu vardır ve özellikle klinik olarak önem taşıyan

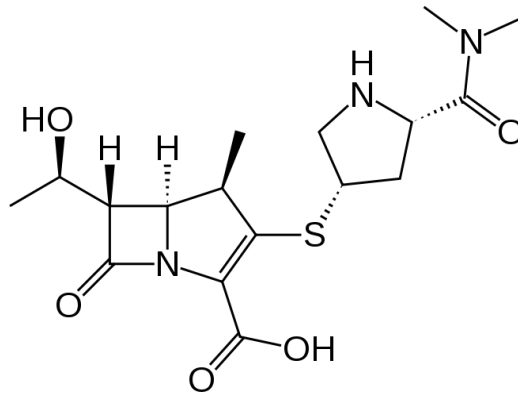


bakterilerin çoğuna etkilidir. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre membranından girişini kolaylaştırırken, penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise *P.aeruginosa*' ya karşı etkinlik sağlamaktadır (Sarı, 2005). Diğer beta-laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. İmipenem bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı *PBP*' lerine yüksek bir afinite gösterir ve ilk önce *PBP2*' ye ve arkasından da *PBP1a*' ya bağlanır. *P.aeruginosa*'da *PBP1a*, *1b*, *2*, *4*, *5* e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder (Yang et al., 1995) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. İmipenemin moleküler yapısı (Vikipedi, 2010).

Meropenem ise oldukça yeni bir antibiyotiktir. Klinik olarak önemli olan hemen tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Neisseria spp.* ve *H. influenzae*' yi içeren pek çok Gram negatif mikroorganizmaya karşı etkilidir. Anaerop mikroorganizmalara karşı meropenemin 2 ila 4 kat daha etkili olduğu bildirilmiştir (Marina et al., 1999). Meropenem, imipenemde olduğu gibi bakterideki başlıca hedefi *PBP2*' dir. Meropenem *P.aeruginosa*'daki *PBP2* ve *PBP3*' e karşı yüksek afinite gösterir. İmipenem, Gram-pozitif organizmalara karşı daha etkiliyken meropenemin, özellikle *P.aeruginosa*' ya daha etkili olduğu bilinmektedir (White et al.,1996) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Meropenemin moleküler yapısı (Wikimedia, 2010).

#### 2.4. *P. aeruginosa*' da Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Direnç, bir mikroorganizmanın, bir antimikrobiyal maddenin öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir. Mikroorganizmalarda iki tip direnç bulunmaktadır. Doğal direnç, bir bakterinin tür özelliği olarak ilacın hedefi alan yapıyı taşıması veya tam tersine antimikrobiyal maddenin hedefe ulaşmasını engelleyecek doğal engellere sahip olmasıyla ortaya çıkar. Mikroorganizmalar genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak, bakteri önceden duyarlı olduğu antimikrobiyal maddeden etkilenmeyebilirler ve bu durumda direnç kazanmış olurlar. Bu direnç kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir (Yüce, 2001). Bir antibiyotiğe karşı duyarlılığını kaybeden mikroorganizma türü, bu antibiyotiğe yakın kimyasal yapıdaki diğer bir antibiyotiğe de direnç kazanabilir ve bu olaya da çapraz direnç adı verilir (Cingi ve Erol, 1996).

Günümüzde geniş spektrumlu pek çok antibiyotığın yaygın kullanımına bağlı olarak *Pseudomonas aeruginosa*' da antibiyotik direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç göstermekte ve bu nedenle etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır (Pollack, 1995).

Özellikle yoğun bakım birimlerinde hemen her antibiyotiğe yüksek oranda direnç gösteren ve çoklu ilaç direnç taşıyan önemli nozokomiyal bir patojen olan *P.aeruginosa*' nın karbapenemler dahil beta-laktamların çoğu, aminoglikozitler ve kinolonlara karşı direnci %40' dan fazladır (Vahaboğlu, 2001).

Toplumdan kazanılmış *P.aeruginosa* izolatları genellikle antipseudömonal penisilinlere (tikarsilin ve piperasilin), aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), siprofloksasine, sefoperazona, seftazidime, meropeneme ve imipeneme duyarlıdır. *P. aeruginosa* genetik olarak, antistafilokokal penisilinler, sulbaktam-ampisilin, ampisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asid, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, trimetoprim sulfametaksazol, nalidiksik asid gibi birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir (Hancock, 1998).

*P.aeruginosa*' da pek çok antibiyotiğe karşı olan doğal direnç nedenleri arasında; ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ve kromozomal indüklenebilir ya da dereprese AmpC beta-laktamaz enzimlerinin varlığı sayılabilir.

*P. aeruginosa*'da beta-laktam ajanlara, özellikle karbapenemlere karşı dirençte rol alan en önemli kazanılmış direnç mekanizması ise sahip oldukları metallo-beta-laktamazlardır (Pai, 2001).

#### **2.4.1. Biyofilm oluşumundan dolayı direnç**

Biyofilm içerisinde büyüyen bakteriler, planktonik olarak büyüyenlere göre antibiyotiklere çok daha fazla dirençlidirler. Biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı direncini sağlayan faktörler arasında yavaş büyüme, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü alginat polimerlerine bağlanmasıyla oluşan penetrasyon bariyeri, bakteride beta laktamazların varlığı sayılabilir (Nichols et al., 1988).

#### **2.4.2. Hedef *PBP* moleküllerinin değişmesi**

*PBP* lerin değişime bağlı gelişen direnç kromozomal mutasyonların sonucunda ortaya çıkar. Bu da *PBP* nin antibiyotiğe affinitesinin azalması, *PBP* sayısında azalma olması ya da beta-laktam antibiyotiklere düşük affinite gösteren yeni *PBP* lerin sentezlenmesi yolu ile olur. Ancak *PBP* lerdeki değişikliklere bağlı gelişen direnç Gram negatif mikroorganizmalarda daha az yaygın olmasına rağmen klinikte *P. aeruginosa*'nın klinik izolatlarında *PBP* değişiklikleri bildirilmiştir (Yorgancıgil, 1999).

#### **2.4.3. Dış Membran Geçirgenliği**

Mikroorganizmalar için oldukça önemli olan dış membranın özel bir beta laktam antibiyotiğine karşı geçirgenliğinin az olması o mikroorganizmanın doğal bir özelliğidir. Antimikrobiyal tedavi sonrasında dış membran geçirgenliğinin azalması, porin proteinlerinde oluşan değişim sonucudur. Beta laktam antibiyotiklerin çoğu da hidrofilik yan zincir içerdiklerinden meydana gelen bu değişimlerden etkilenirler (Gülay, 2008)

Membran porin proteinlerdeki bu değişimler mutasyon sonucunda oluşur ve dış membran geçirgenliği azalarak dirençli suşlar ortaya çıkar. *P. aeruginosa*' da dış membranındaki asıl porin proteini OprF iken, OprB, OprC, OprD, OprE yardımcı porin proteinleridir. *P. aeruginosa* suşlarında OprD porin proteindeki değişim

karbapenem direncine yol açabilir. *P. aeruginosa* tedavisinde ilk haftanın sonunda OprD kaybı ile yaklaşık olarak % 50 oranında karbapenem direnci saptandığı gösterilmiştir (Louis et al., 1999; Nikaido, 1998; Yüce,2001).

OprD (dış membran porin proteini) proteininin yokluğu, karbapenem grubu antibiyotikler içinde özellikle imipenem direncinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin, OprD proteini olmayan izolatlarda, imipenem minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerinin meropeneme göre dört kat arttığı belirlenmiştir. Karbapenemlere karşı dirençte OprD kaybı ile birlikte aktif pompa sistemleri veya beta-laktamaz enzimlerinin aşırı üretimi gibi ikinci bir mekanizmanın daha rol aldığı bilinmektedir (Livermore,1992).

#### **2.4.4. Aktif Pompalama Sistemi ile İlacın Dışarı Atılması**

Beta laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmaları aktif dışa pompalama sistemleridir ve en iyi *P. aeruginosa*' da araştırılmıştır. Aktif dışa pompalama sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasını ve antimikrobiyal maddelerin dışarı atılmasına neden olur (Nikaido, 1998).

Antibiyotiklerin hücre dışına atılımını sağlayan aktif pompa sistemi ilk kez tetrasiklinler için belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY aktif dışa pompalama sistemleri tanımlanmıştır ve bunların içinde MexAB-OprM aktif dışa pompalama sistemi en iyi tanımlanmış olanıdır (Nikaido, 1998). MexAB-OprM ilaç atım pompası, başta beta-laktam ajanlar olmak üzere kinolon, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfametoksazol direncine de neden olmaktadır (Pumbwe and Piddock, 2000).

MexAB-OprM sistemi aktif olan suşların, meropenemin de içinde bulunduğu pek çok antibiyotiğe dirençli oldukları halde imipeneme karşı direnç geliştirmedikleri saptanmıştır. Bunun en önemli nedeni, ilaç atım pompasının substrat profilinden kaynaklanmaktadır. Meropenemin ikinci pozisyonunda hidrofobik bir yan zincir bulunmaktadır ve ilaç atım pompası için uygun bir substrattır. Ancak imipenem ikinci pozisyonunda bulunan hidrofilik yan zinciri nedeniyle MexAB-OprM sisteminin substratı değildir (Köhler et al., 1999; Srikumar et al., 1998).

*P.aeruginosa*' da tanımlanmış diğer ilaç atım pompalarından biri de MexCD-OprJ sistemidir ve bu sistemi negatif yönde regüle eden *nfxB* geninde meydana gelen mutasyonla *nfxB* mutantlar oluşmaktadır (Higgins et al., 2003). Bunun sonucunda ise dördüncü kuşak sefalosporinlerden sefpirom, kinolon, kloramfenikol ve tetrasikline direnç gelişimine neden olur (Hocquet et al., 2003).

Diğer bir sistem olan MexEF-OprN sisteminin aktif hale gelmesi ile oluşan *nfxC* mutantları ise imipenem, kinolon ve tetrasiklinlere direnç gelişiminden sorumludur (Pumbwe and Piddock, 2000; Schweizer, 1998). MexXY ilaç atım sisteminin ise, bazı *P.aeruginosa* suşlarında MexAB-OprM sistemiyle beraber bulunduğu saptanmıştır. Bu sistemin aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolit direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bütün bu sistemlerden farklı olarak *P.aeruginosa*' da tanımlanmış olan diğer iki sistem daha vardır. Bunlar MexJK ve MexGHI-OpmD sistemleridir (Evans et al., 2001).

#### **2.4.5. Beta-Laktamazlar**

Beta laktam antibiyotikleri günümüzde en zık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedir. Beta laktam antibiyotikleri bakteri hücreindeki asıl hedefleri hücre duvarı sentezinin transpeptidasyon aşamasını katalizleyen penisilin bağlayan proteinler (*PBP*)' dir. Beta-laktam antibiyotiklerin bu proteinlere bağlanması, proteinin kendi substratına bağlanmasını engeller. Bu bağlamda peptidoglikan tabakanın sentezi inhibe olur ve bakteri hücresi lizize uğrar. Ancak bakterilerde beta- laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir (Albay, 1994). Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç *PBP* de oluşan değişiklikler, beta-laktamaz enzimleri ve permeabiliteye bağlı olarak gelişir ve çok da yaygın kullanılmalarının sonucunda beta laktam antibiyotiklere direnç gittikçe artmaktadır (Yorgancıgil, 1999).

Beta-laktamazlar, beta laktam grubu antibiyotiklerde beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak etki gösterirler. Beta-laktamazlar kromozomal ya da plazmid kaynaklıdır. Beta laktamazlar ilk olarak penisilinleri hidrolize etmeleriyle tanımlanmıştır. Daha sonra her yeni beta laktam grubu antibiyotik kullanılmasıyla yeni beta-laktamazlar eklenmiştir (Bush, 1989). Bu enzimlerin sınıflaması ilk defa 1973 yılında Richmand ve Sykes tarafından yapılmış, 1976 yılında ise Sykes ve

Matthew tarafından genişletilmiştir. 1980 yılında Ambler beta-laktamaz enzimlerinin aminoasit ve nükleotid dizilerindeki benzerlikleri dikkate alarak bu enzimleri dört grup altında toplamıştır. Moleküler sınıf A, C ve D' nin aktif bölgelerinde serin bulunurken, sınıf B' de ise çinko bulunduğu belirtilmiştir. Bush-Jacoby-Medeiros'un gruplandırılmasında ise bu enzimler substrat profillerine göre 4 temel gruba ve bu gruplarda kendi aralarında alt gruplara ayrılmıştır. Substrat özgüllüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel alındığı fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri sınıflandırmış ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram ile ilişki kurulabilmesi sağlamıştır (Bush et al., 1995; Yüce, 2001).

Moleküler sınıflandırmada sınıf C' de yer alan Grup 1' de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar bulunur. Moleküler sınıf olarak A ve D' de yer alan Grup 2 ise substrat profilindeki farklılıklar nedeniyle birkaç alt gruba ayrılır ve bu grup beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Grup 3 ise, EDTA dışındaki beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan ve moleküler sınıf B' de yer alan metallo-beta laktamazlardan oluşur. Aktif bölgelerinde serin yerine bir  $Zn^{+2}$  iyonu bulunan enzimlerdir. Bunlar monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta-laktam antibiyotiklerini hidroliz edebilirler. Grup 4' te ise klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır (Bush et al., 1995).

*P.aeruginosa'* da bulunan geniş spektrumlu beta-laktamazlar substrat profilleri açısından benzerlik taşıyorsa aminoasit dizilimleri açısından oldukça farklıdır ve bu enzimler TEM, SHV, OXA, PER, VEB, GES ve IBC şeklindedir (Weldhagen et al., 2003). SHV ve TEM benzeri enzimler plazmit kökenli olup *P.aeruginosa'* da nadir olarak görülmektedir (Chanawong et al., 2001). Daha çok *P.aeruginosa'* da saptanan ve oksasiline hidroliz edebilen OXA (oksalazinaz) tipi enzimler ise metallo-beta-laktamazlarla birlikte sınıf 1 integronlar içinde bulunur ve direncin yayılmasını kolaylaştırır. *P.aeruginosa'* da bulunabilen diğer önemli beta-laktamaz, penisilin, sefalosporin ve karbapenemleri hidrolize edebilen metallo-beta-laktamazlardır (Philippon et al., 1991).

## 2.5. Karbapenemazlar

Karbapenemazlar, en geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinliğe sahip beta-laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar

olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil diğer beta-laktam antibiyotiklere de etkilidirler. Bundan dolayı sadece karbapenem grubu beta-laktam ajanlara afinitesi diğer beta-laktamlara kıyasla daha fazla olan metalloenzimler “karbapenemaz” olarak adlandırılmaktadır (Rasmussen and Bush, 1997). Karbapenemazlar beta-laktamazların A (penisilinaz), D (oksasilinaz) veya B (metalloenzim) moleküler sınıfına ait olabilirler. A sınıfı karbapenemazlar Bush’un sınıflandırmasında 2f grubunda yer alır ve serin karbapenemazlardır. Klavulanik asit ile inhibe olurlar (Nordmann and Poirel, 2002). B sınıfı karbapenemazlar metallo-beta laktamazlardır ve klinik açıdan en önemli karbapenemazlardır. Bunlar aztreonam dışındaki tüm beta laktamları hidrolizleyen IMP ve VIM serisi metallo enzimleri içerirler. A sınıfı karbapenemazlar gibi klavulanik asit yada tazobaktamı içeren beta-laktam inhibitörleri ile inhibe olmazlar ve aktif bölgelerinde serin aminoasidi içerirler. D sınıfındaki karbapenemazlar *Acinetobacter baumannii*’de rastlanan ve karbapenemlere düşük düzeyde direnç ya da azalmış duyarlılığa yol açan oksasilinazlar, yani OXA tipi enzimlerdir ve 4 alt grupta toplanmışlardır (Bush, 2001).

### **2.5.1. Metallo-Beta-Laktamazlar**

Karbapenemlere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma metallo-beta-laktamazların varlığıdır. Diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde bir çinko iyonu bulunur. Bu farklı kimyasal yapıları nedeniyle klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta-laktamaz inhibitörleri ile baskılanamazlar. Metallo-beta-laktamazların inaktivasyonu EDTA gibi bir metal şelatörü ile mümkün olur. En önemli özellikleri monobaktamlar dışında, karbapenemler de dahil olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz edebilmeleridir (Nordmann and Poirel, 2002).

Metallo-beta-laktamazlar, 1980 yılında Ambler tarafından yapılan sınıflandırmada serin beta-laktamazlar içinde bulunmaktadır. 1989 yılında Bush tarafından yapılan sınıflandırmada ise metallo-beta-laktamaz enzimlerinin substrat profilleri (özellikle imipenem hidrolizi), EDTA’ya duyarlı olmaları ve serin beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe olmamaları göz önünde bulundurulmuştur. Bu sınıflandırma 1995 yılında güncelleştirilmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir. MBL’ler fonksiyonel özelliklerine göre de 3 alt gruba ayrılmıştır. Grup 3a’ daki enzimler geniş

spektrumlu aktiviteye sahiptir. Maksimum aktivite göstermeleri için ortamda çinko iyonunun bulunması gereklidir. Bu grupta *P. aeruginosa*'da saptanan VIM 1–3 enzimleri de yer almaktadır. Grup 3b' de bulunan enzimler özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih ederler ve bazen gerçek karbapenemaz olarak adlandırılır, çünkü grup 3a enzimlerinin aksine penisilin ve sefalosporin üzerinde hiç hidrolitik etkileri yoktur. Grup 3c' de bulunan enzimler ise diğer beta-laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermektedirler. Bu enzim yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılmaktadır. Ancak her üç grubunda ortak özellikleri EDTA ile inhibe olmalarıdır (Rasmussen and Bush, 1997).

MBL'leri moleküler düzeyde sınıflandırmak için çok sayıda çalışmalar yapılmış ve oluşturulan filogenetik şema ile sınıf B enzimleri sekans özellikleri ve yapısal özelliklerine göre üç alt sınıfta incelenmiştir. İçinde transfer edilebilir MBL'ler olan IMP, VIM, SPM-1 ve GIM ailelerinde yer aldığı B1 alt sınıfı, üç histidin ve bir sistein arasında koordinasyon kuran bir anahtar çinko iyonuna sahip olma esasına dayanır. *Aeromonas*' a ait MBL ve *Serratia*' nın SFH-1 enzimlerinin de yer aldığı B2 alt sınıfına ait enzimlerde başlıca çinko bağlayıcı motif olan NXHXD dizisinin birinci pozisyonunda histidin yerine asparajin bulunur. B3 alt sınıfında bulunan MBL L1 enzimi ise bu grubun tek üyesidir ve diğer alt sınıflarla yapısal homolojisi olmasına rağmen, sekans homolojisi bulunmamaktadır (Walsh et al., 2005). MBL ilk defa *Bacillus cereus*, *Aeromonas* ve *Stenotrophomonas maltophilia* gibi fırsatçı patojenlerin kromozomal enzimleriyle ilgili çalışmalarda tesbit edilmiştir (Queenan and Bush, 2007)

#### **2.5.1.1. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-Beta-Laktamazlar**

Kromozomal olarak MBL kodlayan bakteriler arasında; *Bacillus cereus* (BCII), *Bacillus anthracis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Aeromonas hydrophilia* (CphA) , *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB yada GOB–1), *Chryseobacterium indologenes* (IND–1), *Legionella gormannii* (FEZ–1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1 B), *Myroides spp* (TUS–1, MUS–1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN–1) ve *Serratia fonticola* (SFH–1) olarak sayılabilir. Kromozomal kökenli bu enzimler



genellikle serin beta-laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar (Walsh et al., 2005).

### 2.5.1.2. Transfer edilebilir Metallo-Beta-Laktamazlar

Transfer edilebilir MBL içinde en yaygın bulunanlar VIM, IMP, GIM ve SPM olarak adlandırılan ailelerdir. Bu enzimleri kodlayan genler çeşitli integron yapıları içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. Bu integronlar plazmid veya transpozonla birleştiğinde bakteriler arası transfer kolaylaşmaktadır. Sadece onları üreten türlerin yayılmasıyla yayılabilen kromozomal MBL'lerin aksine, kazanılmış ya da transfer edilebilen MBL'lerin yayılımında çok büyük hızlanma görülmüştür. (Walsh et al., 2005).

Transfer edilebilir MBL içinde bulunan IMP, VIM ve GIM-1 tipi enzimlerin büyük çoğunluğu sınıf 1 integronu içindeki gen kaseti olarak bulunsada, IMP tipi MBL'ler bazen sınıf 3 integronu içinde bulunabilirler. İntegronlar ; biri integronda diğeri gen kasetinde bulunan iki DNA bölgesi arasındaki bölgeye özgü rekombinasyon olaylarında gen kasetlerini elde etme yeteneğine sahiptir. İntegronlar, 5' korunmuş bölge, 3' korunmuş bölge ve değişken bölge olmak üzere 3 farklı bölge içermektedir. Gen kasetleri, yaklaşık 1 kb boyutunda, tek bir gen ve 59 baz element adı verilen rekombinasyon bölgesini içeren, küçük dairesel, DNA parçalarından oluşmaktadır. Genellikle MBL enzimini kodlayan gen kasetleri yanında aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan aacA4 geni de bulunmaktadır. Böylece amikasin, gentamisin, tobramisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine direnç gelişimi gözlenmektedir. Aminoglikozid ve beta-laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğeri serbestçe dolaşabilir, bir organizmadan diğeri kendi başlarına hareket edemezler bu nedenle plazmidler ve transpozonlar gibi başka genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar (Walsh et al., 2005).

#### ➤ IMP

Transfer edilebilen ilk MBL 1988 yılında Japonya' da *P. aeruginosa*'nın GN17203 suşunda ait konjugatif plazmit üzerinde bulunmuştur. İmipenemi parçaladığı için enzime IMP-1 adı verilmiş ve üç yıl sonra aynı enzim Japonya' da üriner sistem

enfeksiyonu nedeniyle yatan hastadan izole edilen *Serratia marcescens*' in Tn9106 suşunda bulunmuştur. Bu suşlardan izole edilen IMP-1 enziminin 120 kb büyüklüğünde bir plazmidde, sınıf 3 integron içinde *aac(6')/b* benzeri genle yan yana yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Walsh et al., 2005).

IMP-1 *P. aeruginosa*' da tanımlanan ilk MBL'dir. Enzimin gen bölgesi olan *bla<sub>IMP</sub>* genin varlığı, Japonya'da *P. aeruginosa* suşları ve diğer Gram negatif basiller arasında tespit edilmeye başlanmış, daha sonra da Singapur ve Güney Kore' de bildirilmiştir. *bla<sub>IMP</sub>* genin integron elementler ile ilişkisi ve karbapenem antibiyotiklerinin yoğun kullanımı, Japonya' da bu direncin yayılmasına katkıda bulunmuştur (Tsakris et al., 2000).

Yapılan araştırmalar sonucunda IMP-1 enzime benzemekle beraber farklı MBL enzimleri saptanmıştır. Japonya' da IMP-1' in 3 minör varyantı olan IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tanımlanmıştır. Genetik ve kinetik çalışmalarda 169' uncu pozisyondaki serin yerine glisin geçmesiyle penisiline karşı aktivitesinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak IMP-6' nın da aynı şekilde penisiline karşı aktivitesi azalırken, meropeneme karşı aktivitesi oldukça artmıştır (Yano et al., 2001; Iyobe et al., 2000). Bu enzimlerden biri olan IMP-3 ise *Shigella flexneri* izolatından elde edilmiş ve IMP-1' den yalnızca iki aminoasit bakımından farklılık gösterir. Ancak bu farklılık, IMP-3 enziminin penisilinlere olan aktivitesinin düşük olmasına neden olmuştur (Iyobe et al., 2000)

IMP ailesinden Avrupa'da bulunan ilk enzim, İtalya' da *A.baumannii* suşunda saptanan IMP-2' dir (Queenan and Bush, 2007). Transfer edilebilir MBL'ların sadece Japonyada sınırlı kaldığı düşünceleri IMP-2'nin 1997 yılında ve IMP-5' in 1998 yılında İtalya ve Portekiz'de görülmesinden sonra değişmiştir. IMP-2 IMP-1'den 36 aminoasit ve IMP-5, IMP-1'den 17 amino asit değişikliği ile ayrılır. *bla<sub>IMP-2</sub>* geni aminoglikozid direncinden sorumlu *aacA4* ve *aadA1* allellerinin yanında bulunurken, IMP-5 tek bir gen kaseti şeklindedir (Walsh et al., 2005).

1995-2001 yılları arasında Japonya'da toplanan *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* suşlarında IMP enziminin üretimi incelenirken IMP-10 bulunmuştur. *bla<sub>IMP-10</sub>* geni *bla<sub>IMP-1</sub>* geninden farklı olarak 49. pozisyondaki tek bir baz çiftinin değişimi sonucu ortaya çıkmıştır (Iyobe et al., 2002).

Yapılan alışmalar da İtalya' da 2 farklı IMP varyantı daha tanımlanmıştır. 2000 yılında Varessa' da bulunan klinik bir izolat olan *P.putida* tarafından üretilen IMP-12' nin 50 kb'lik transfer edilmeyen bir plazmit üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Docquier et al., 2003) IMP-12' nin IMP-1'den 36 amino asit bakımından fark gösterdiği ve bu farkın penisilinlere karşı aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. IMP-13 enzimi ise Roma' da izole edilen *P. aeruginosa* suşunda bulunmuş ve IMP-1' den 19 amino asit bakımından farklılık gösterdiği saptanmıştır (Toleman et al., 2003).

Geçmişe dönük yapılan çalışmalarda 1994 yılında Hong Kong' da ve 1995' de Canada' da saptanan karbapenem direncinden, *P. aeruginosa*' da saptanan IMP-7 ve *Acinetobacter spp.*' de saptanan IMP-4' ün sorumlu olduğu bulunmuştur (Chu et al., 2001; Gibb et al., 2002)

IMP varyantı olan IMP-8 Tayvan' daki Uluslararası Cheung Kung Hastanesinde bulunmuş ve bu enzime ait gen bölgesinin, 1998 yılında izole edilen *Klebsiella pneumoniae*' de bulunan aacA4 gen gölgesinin yanında ki sınıf 1 integronu içinde yer aldığı belirlenmiştir (Yan et al., 2001).

Avrupa'daki ve Güneydoğu Asya' daki IMP' lar arasında farklar olması IMP allellerinin Japonya' dan dünyaya yayıldığı görüşünü desteklememiştir. Daha çok bu allellerin lokal belirlediği görüşü ileri sürülebilir (Towner et al., 2002; Tysall et al., 2002).

## ➤ VIM

Kazanılan MBL' lerin ikinci dominant grubu VIM (Verona integron-encoded metallo-b-lactamase) tipi enzimlerdir. VIM tipi MBL üreten suşlar ilk olarak Avrupa ülkelerinde rapor edilmiştir. 1999 yılında İtalya' nın Verona şehrinde izole edilen VIM-1 enzimi *P. aeruginosa*' da tanımlanmıştır (Queenan and Bush, 2007). Tanımlanan ilk klinik izolat olan VIM-1' in piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam gibi pek çok beta-laktam antibiyotiğine direnç göstermediği bilinmektedir (Walsh et al., 2005).

VIM-2 ise, 1996 yılında Güney Fransa'da ki nötropenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa*' da tanımlanmıştır. Bu izolat seftazidim,

sefepim ve imipenemi içeren pek çok beta-laktam antibiyotiğine dirençli iken aztreonam karşı duyarlı bulunmuştur (Poirel et al., 2000).

VIM varyantları içerisinde VIM-2 en yaygın olan VIM tipi enzimdir. Yapısal olarak oldukça benzeyen VIM-1 ve VIM-2 arasındaki en önemli fark, VIM-2' nin birçok beta-laktam antibiyotiğine VIM-1'e göre daha sıkı bağlanması ve daha etkili bir şekilde hidroliz edebilmesidir. VIM-1 ve VIM-2' nin amino asit dizisi %7' lik bir farklılık gösterirken, VIM-3 VIM-2' den sadece 2 rezidu bakımından ayrılır (Docquier et al., 2002).

VIM-2' nin ilk olarak Fransa' da tanımlanmasının ardından, VIM-2 üreten *P.aeruginosa* suşları Japonya, Güney Kore, Portekiz, Venezuela, Arjantin, Belçika, Şili ve pek çok ülkede bildirilmiştir (Walsh et al., 2005). VIM-4 üreten *P.aeruginosa* ilk kez Yunanistan' da bildirilmiştir. VIM-4 enzimi VIM-1' den tek bir aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır (Libisch et al., 2004).

VIM-1' den tek bir amino asit ile ayrılan VIM-5 Ankara' da izole edilen *K. pneumoniae* ve *P.aeruginosa* suşlarında saptanmıştır. Bu enzimin aztreonam dahil bütün beta-laktam ajanlara karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Bahar vd., 2004). VIM-6 Singapur' da izole edilen 2 farklı *P. putida* suşunda tanımlanmıştır. VIM-6 VIM-2' den 2 amino asit VIM-3' ten ise tek bir amino asit bakımından farklılık gösterir (Koh et al., 2004). VIM-6' dan sonra tanımlanan VIM-7 Teksas' da izole edilen karbapeneme dirençli *P.aeruginosa* suşunda saptanmıştır (Toleman et al., 2004).

VIM-1 ve VIM-2 birkaç değişik Enterobakter türlerinden tanımlanmış olsa da, bu enzimlerin bilinen en önemli kaynağı *P.aeruginosa*' dır (Lagatolla et al., 2004).

İlk olarak Brezilya' nın Sao Paulo şehrinde bir *P.aeruginosa*' da saptanan SPM-1 enziminin IMP ile %35,5 amino asit benzerliği bulunmuştur. Brezilya' da çeşitli hastane salgınlarına neden olan bu enzimin genetik analizler sonucunda integronda bulunmayıp, CR4 adı verilen yeni bir ortak bölgede yer aldığı görülmüştür (Poirel et al., 2004). Diğer MBL genlerinden farklı olarak bir integron yada transpozon ile ilişkili değildir ve 180 kb' lik bir plazmidde bulunduğu belirtilmiştir. SPM-1 enzimi penisilin grubu içinde yer alan ampisilin, piperasilin,

karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızla hidroliz edebilmektedir. Ancak enzimin sefalosporinlere afinitesi penisilinlerden daha fazladır. (Walsh et al., 2005).

Almanya' da 2002 yılında 5 farklı hastaneden izole edilen *P.aeuruginosa* suşlarında 22 kb' lik bir plazmid içinde sınıf 1 integrona yerleşmiş şekilde bulunan GIM-1 (german imipenemase) enzimi tanımlanmıştır. GIM-1 enzimi VIM ile %30, IMP ile %43, SPM ile %29 homolojiye sahiptir (Castanheira et al., 2004).

IMP ve VIM tipi transfer edilebilir MBL' ler tüm dünyada yayılmaya devam ederken, SIM, GIM ve SPM tipi enzimlere halen ilk rapor edildikleri ülkeler dışında rastlanmamıştır (Queenan and Bush, 2007).

## **2.6. Metallo-Beta-Laktamazların Araştırılması**

MBL' ler aztreonam dışında bütün beta-laktam antibiyotiklerini etkin bir şekilde hidroliz etmektedir. Bundan dolayı MBL üreten Gram negatif basillerin tespit edilmesi hem hastalara en uygun tedavinin verilmesi hemde direnç yayılımının kontrol altına alınması bakımından hayati önem taşır. Ancak CLSI verileri MBL üreten izolatların teşhisini sağlayan herhangi bir yöntem ortaya koymamıştır (Lee et al., 2003)

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL enziminin belirlenmesinde fenotipik testler kullanılmaktadır. Ancak bugüne kadar duyarlılığı ve özgüllüğü belirlenip standardize edilen bir test henüz bulunmamıştır. MBL aktivitesi taşıyan mikroorganizmaların tanımlanmasında, enzimin EDTA ya da 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliğinden faydalanılarak çeşitli fenotipik yöntemler geliştirilmiştir (Yan et al., 2001). Bu amaçla imipenem ve EDTA' nın ya da seftazidim ve 2-merkaptopropionik asitin kullanıldığı çift disk sinerji veya kombine disk testleri, imipeneme duyarlı *E.coli'* nin MBL üreten bakteri ile birlikte bulunduğu inhibisyon zonunun azalmasıyla değerlendirilen Modifiye Hodge Testi, E testi ve mikrodilüsyon testi uygulanabilecek fenotipik testler arasındadır (Yan et al., 2004). E-test ve mikrodilüsyon testinin her ikisinin de karbapenem dirençli *P.aeuruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarındaki MBL aktivitesinin tesbitinde güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Migliavacca et al., 2002).

### **2.6.1. Modifiye Hodge Testi**

Hodge ve arkadaşları *N. gonorrhoeae*' de penisilinaz aktivitesinin gösterilmesi için Hodge testini kullanmışlar, ancak bu test daha sonra MBL enziminin saptamak için Modifiye Hodge testi olarak geliştirilmiştir. Bu test için imipenem hassas *E. coli* ATCC 25922 suşu, imipenem diski ve test edilecek bakteri suşu gerekmektedir. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine göre disk difüzyon testindeki gibi Mueller-Hinton agara yayılır. IMP diski merkeze yerleştirilir. İmipenem diskinin tam kenarından başlanıp dışa doğru doğrusal şekilde imipenem dirençli suşun ekimi yapılır. Bir gecelik inkübasyon sonunda inhibisyon zonunda yonca yaprağı şeklinde bozulmanın olması MBL pozitifliği olarak kabul edilir. Ayrıca yapılan çalışmalar çinko sülfat (140 mg /disk) imipenem diskinin yada Mueller-Hinton agara eklenmesi testin duyarlılığını arttırabileceğini ortaya koymuştur (Lee et al., 2003; Lee et al., 2001).

### **2.6.2. Çift Disk Sinerji Testi**

IMP, MEM veya CAZ diskleri ile EDTA, 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA), sodyum merkaptopropiyonik asit (SMA) gibi metal şelatörü içeren diskler yan yana yerleştirilerek iki disk arasındaki sinerjistik inhibisyon zonu gözlenir. Boş disk üzerine EDTA eklendikten sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi MBL pozitif olarak değerlendirilir (Lee et al., 2001). Aynı yöntemle CAZ-MPA yada CAZ-SMA arasında da bir inhibisyon zonu oluşturularak MBL araştırması yapılabilir (Arakawa et al., 2000).

### **2.6.3. Kombine Disk Testi**

Test edilecek bakteri MHA' ya yayılır ve aralarında 22 cm olacak şekilde iki imipenem diski yerleştirilir. Disklerden birisinin üzerine 0.5 M EDTA eklenir ve bir gecelik inkübasyondan sonra IMP diski ile IMP-EDTA'lı diskin zon çaplarında 7 mm veya daha fazla fark olması MBL pozitifliği olarak kabul edilir (Walsh et al., 2002; Yan et al., 2004).

### **2.6.4. E Testi**

Uygulama ve yorum kolaylığı nedeni ile tercih edilebilen bir yöntemdir. IMP ya da CAZ' e , EDTA ya da 2-MPA eklenerek E-test stripleri geliştirilmiştir. CLSI önerdiği

şekilde MHA' ya test edilecek bakterinin ekimi yapılır ve test stipleri yerleştirilir. Test şeridinin bir ucunda IMP diğer ucu EDTA' lı IMP içermektedir. 16-18 saatlik inkübasyon sonunda IMP/IMP-EDTA MİK oranının 8 kat azalması MBL pozitif olarak kabul edilir (Walsh et al., 2002; Yan et al., 2004).

### **2.6.5. Mikrodilüsyon Testi**

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılmaya da uygun olan mikrodilüsyon MBL tarama testi; basit, duyarlı ve yüksek özgüllüğe sahiptir. İmipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile ölçülür, sonra metal şelatörlerden EDTA ve fenantirolin eklenerek tekrar MİK değerine bakılır, 8 kat azalmanın gözlenmesi MBL pozitif olarak kabul edilir (Migliavacca et al., 2002).

Günümüzde tarama yöntemleri henüz ideal sonuca ulaşmamıştır. Özellikle *P. aeruginosa* değişken olan OprD düzeylerine bağlı olarak yanlış pozitiflik verebilmektedir IMP' in EDTA ile kombine edilerek kullanılmasında bazı durumlarda yanlış sonuç verebildiği açıklanmaktadır. MBL üretmeyen *P. aeruginosa*' lar çok az sayıda da olsa, EDTA varlığında imipenem MİK değerini düşürdüğü düşünülür. Bu durum kısmen çinkonun OprD üzerine ve yeni tanımlanmış CzcR-CzcS sistemleri üzerine olan etkisine bağlıdır. Bu nedenle gittikçe artan sayıda MBL içeren *Enterobacteriaceae* ailesi ve *P. aeruginosa* kökenleri için, fenotipik metodların duyarlılık ve özgüllüklerinin sürekli olarak gözden geçirilmesi gerekmektedir (Conejo et al., 2003; Walsh et al., 2005).

Moleküler olmayan yöntemlerden en önemlisi “altın standart” olarak tanımlanan ve duyarlılığı en yüksek olan test, bakteriden saflaştırılarak elde edilen enzimin özel spektrofotometrik cihazlarla imipenem ve meropenem hidrolizini göstermektir. Bu enzim aktivitesi EDTA varlığında inhibe olmaktadır. MBL ların tesbit edilmesinde genotipik yöntemlerde kullanılabilir ve genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir (Walsh et al., 2005).

### **2.6.6. Moleküler Yöntemler**

Mikroorganizmadaki MBL geninin varlığını belirleyebilmek amacıyla PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), blot hibridizasyon, nükleotit sekans amplifikasyonu, izoelektrik fokuslama ve poliakrilamid jel elektroforezi gibi yöntemlerden

yararlanılabilir (Lee et al., 2001). Birçok MBL, sınıf 1 integronlarına kuvvetli bir şekilde bağılırlar, buna dayanarak bu gen bölgesi amplifiye edilebilir. Ayrıca bu gen bölgesinin ve yakın ilişkide olduğu diğer bölgelerin yapısı hakkında da bize bilgi verir. MBL'lerin genotipik tayininde PCR dışında daha hassas bir yöntem olan DNA prob' ları da kullanılabilir. Moleküler yöntemlerin altın standardı ise sekans analizi ve klonlama yöntemleridir (Walsh et al., 2005).



### 3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLERİ

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamızda Eylül 2008-Mayıs 2009 tarihleri arasında, Ankara' daki üç farklı hastanenin farklı servislerinden mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen idrar, yara yeri sürüntüsü, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat, ETA, Pü, kan, kulak ve göz kültürleri gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilen *Pseudomonas* suşları toplandı. Olası *Pseudomonas* suşlarının makroskopik ve mikroskopik incelemeleri gerçekleştirildi. Bu suşların biyokimyasal özelliklerine dayanarak uygulanan testler ile fenotipik teşhisleri sonucunda, Hastane 1' den 50, Hastane 2' den 27 ve Hastane 3' den 13 olmak üzere toplam 90 suş *Pseudomonas* olarak tanımlandı ve bu suşların Cetrimide agar ile tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirildi.

#### 3.2 *Pseudomonas* Suşlarının Tanımlanması

Klinik materyallerinden izole edilen *Pseudomonas* suşlarının EMB agarda laktoz fermentasyonu, oksidaz testi, üre testi, üç şekerli demir testi, IMVC testleri, nitrat redüksiyonu testi ve 42°C' de üreme testi ile fenotipik yöntemlerle tanımlanması gerçekleştirildi.

##### 3.2.1. *Pseudomonas* Suşlarında Laktoz Fermentasyonunun ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi

Eozin Metilen Mavisı Agar (EMB), Gram negatif enterik ve enterik benzeri bakterilerin izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılan seçici ve ayırt edici bir besiyeridir. Besiyeri bileşimindeki eozin Y ve metilen mavisı Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe eder. Besiyerinde mikroorganizmaların ayırt edilmesi ise laktoz fermentasyonuna bağlıdır. Bu bağlamda mikroorganizma laktozu fermente edecek enzimlere sahipse koyu pembe renkli mukoid koloniler ya da menekşe renkli ve yansıyan ışıkla yeşilimsi metalik parlak renkli koloniler gözlenir. Ancak mikroorganizma laktozu fermente edecek enzimlere sahip değilse açık renkli ya da saydam koloniler görülür (Mahon and Manuselis, 2000). Dehidre besiyeri 36.0 g/L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü. Hazırlanmış besiyerinin pH' sı 7,1 ± 0,2' ye ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi (Mikrobiyoloji, 2009). Test edilecek *Pseudomonas* suşları EMB agara inoküle edildi ve 37°C' de

24 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda *Pseudomonas* suşlarının renksiz koloniler oluşturduğu saptandı.

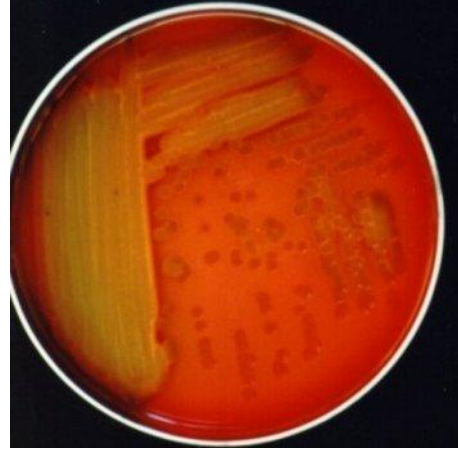
Seçici ve ayırt edici bir besiyeri olan MacConkey agar çalışmamızda kullanılan diğer bir besiyeridir. Besiyerinde bulunan safra tuzları ve kristal viyole boyası, Gram pozitif bakterilerin ve fungusların üremesini inhibe eder. Besiyeri bileşiminde bir pH indikatörü olarak bulunan nötral kırmızısı ise bu besiyerinin ayırt edicilik özelliğini sağlamaktadır (Forbes et al., 2002). Eğer mikroorganizma laktozu karbon kaynağı olarak kullanabilirse, laktoz fermentasyonu sonucunda oluşan asit, indikatör nötral kırmızısının renginin değişmesine ve sonuçta pembe-kırmızı koloniler oluşmasına ve koloni etrafında safra tuzlarının presipitasyonundan dolayı bir bulanıklığa neden olur. Laktozu fermente edemeyen Gram negatif basiller ise renksiz yada şeffaf koloniler oluşturur (Mahon and Manuselis, 2000). Dehidre besiyeri 50.0 g/L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü ve hazırlanmış besiyeri kırmızı renkte olup pH 7,1 ± 0,2' ye ayarlandı ve otoklavda sterilize edildi (Merck, 2009). Test edilecek *Pseudomonas* suşları MacConkey agara inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda non-fermentatif olan *Pseudomonas* suşlarının, *Pseudomonas aeruginosa'* ya özgü piyosyanin pigmentinden dolayı mavi-yeşil koloniler oluşturduğu görüldü (Baştürk, 2005) (Şekil 3.1).

### **3.2.2. Kanlı Agarda Beta-Hemolizin ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi**

Kanlı agar zengin besin içeriğinden dolayı pek çok mikroorganizmanın gelişimi için uygundur. Test edilecek *Pseudomonas* suşları kanlı agara inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inübasyona tabii tutuldu. Pek çok *Pseudomonas* suşunun koyun kanlı agarda beta-hemoliz meydana getirdiği ve sahip olduğu piyosyanin pigmentinden dolayı karakterisitik yeşil metalik parlaklık oluşturduğu görüldü. Aynı zamanda bir kısmının mukoid koloniler oluştururken bir kısmının da mukoid olmayan koloniler oluşturduğu gözlemlendi (Mahon and Manuselis, 2000) (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. *Pseudomonas* suşlarının MacConkey agardaki koloni morfolojisi



Şekil 3.2. *Pseudomonas* suşlarının kanlı agardaki koloni morfolojisi ve beta-hemolizi ([www.microbiologyatlas.kvl.dk](http://www.microbiologyatlas.kvl.dk))

### 3.2.3. *Pseudomonas* Suşlarının Gram Boyama Yöntemi ile Mikroskopik İncelenmesi

Gram boyama metodu Danimarkalı bilim adamı Hans Christian Gram tarafından bulunmuştur. Bu yöntemin temeli bakteri hücre duvarının fiziksel ve kimyasal yapısına dayanır ve bu nedenle boyama işlemi sonunda Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler farklı renkte boyanır (Vikipedi, 2010). Gram negatif bir mikroorganizma olan *Pseudomonas*' in MacConkey agardaki tek bir kolonisi alınıp lam yüzeyindeki serum fizyolojik ile süspanse edildi, preparat kurutuldu ve ateş ile tespit edildi. Gram boyama aşamaları; kristal viyole 1 dakika, lugol 1 dakika, alkol ile dekolorizasyon 15 saniye ve bazik fuksin 30 saniye şeklinde uygulanırdı. Her boyama işleminin ardından su ile yıkandı, kurutuldu ve 100X' lük objektifte

incelenmek üzere preparat üzerine immersiyon yağı damlatıldı. Sonuçta *Pseudomonas*' ın Gram negatif kokobasil morfolojisi görüldü (Şekil 3.3).



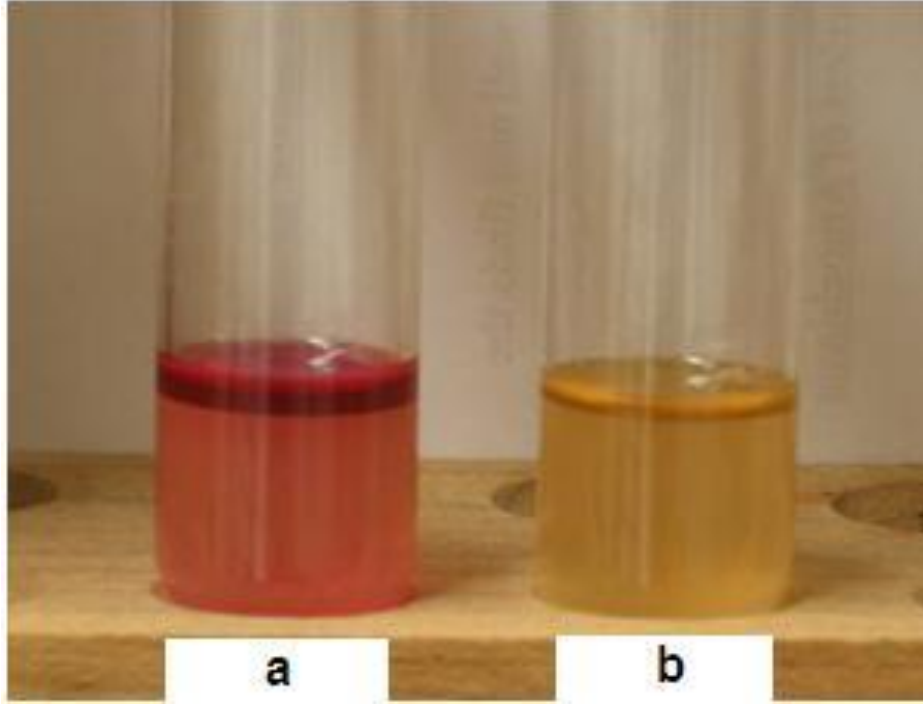
Şekil 3.3. *Pseudomonas* suşlarının Gram boyama yöntemi ile mikroskopik görüntüsü ([www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)).

### 3.3. *Pseudomonas* Suşlarının Tanımlanmasında Uygulanan Diğer Biyokimyasal Testler

#### 3.3.1. IMVC Testleri

##### 3.3.1.2. İndol Testi

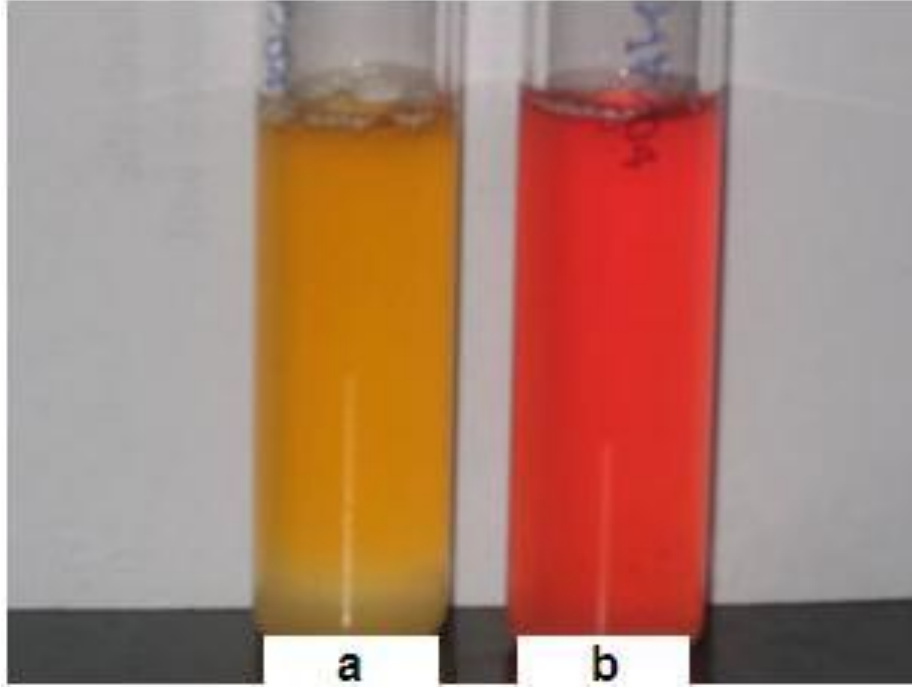
Çalışmamızda kullanılan *Pseudomonas* suşlarında triptofanaz enziminin varlığını araştırmak üzere indol testi uygulandı. Eğer bakteri triptofanı parçalayacak triptofanaz enzimine sahipse, bu yıkım sonucunda indol, pirüvik asit ve amonyak ürünleri oluşacaktır (Koneman et al.,1997). %1 triptofan içeren sıvı besiyerleri her tüpte 5ml olacak şekilde hazırlandı ve ve otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edildi. Test edilecek *Pseudomonas* suşları triptofanlı sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C' de 48 saat inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyondan sonra kültürlerin üzerine Kovaks ayırıcından 0.5 ml ilave edildi ve karıştırıldı. Bir-iki dakika içinde tüpün üst kısmında kırmızı halka meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilirken, *Pseudomonas* suşlarının sarımsı bir halka meydana getirdiği görüldü ve test sonucu indol negatif olarak değerlendirildi (Mikrobiyoloji, 2009) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İndol testi sonuçları (a; indol pozitif, b; indol negatif-*Pseudomonas*)  
(<http://www.blinn.edu>)

### 3.3.1.3. Metil Kırmızısı Testi

Çalışmamızda kullanılan *Pseudomonas* suşlarının glukozdan karışık asit fermentasyonu ile asit oluşturup oluşturmadıklarını belirleyebilmek amacı ile metil kırmızısı testi yapıldı. Bu testte kullanılan metil kırmızısı indikatörü pH: 6.2' de sarı, pH: 4.4 ve altında ise kırmızı bir renk oluşturur (Forbes et al., 2002). Dehidre besiyeri 17,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip, pH' sı 7.0' a ayarlanarak deney tüplerine 5 'er mL olarak dağıtıldı ve otoklavda 110 °C' de 25 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak renkteydi (Mikrobiyoloji, 2009). Test edilecek *Pseudomonas* suşları besiyerlerine inoküle edildi 37°C' de 48 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyondan sonra üzerine birkaç damla metil kırmızısı ilave edilerek karıştırıldı. Metil kırmızısı indikatörü; metil kırmızısı 0,1 g; %96' lık etil alkol 300 ml; distile su 200 ml bileşimindedir. Belirgin bir kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilirken, *Pseudomonas* suşlarında renk değişimi gözlenmediğinden metil kırmızı testi negatif olarak değerlendirildi. (Forbes et al., 2002) (Şekil 3.5).



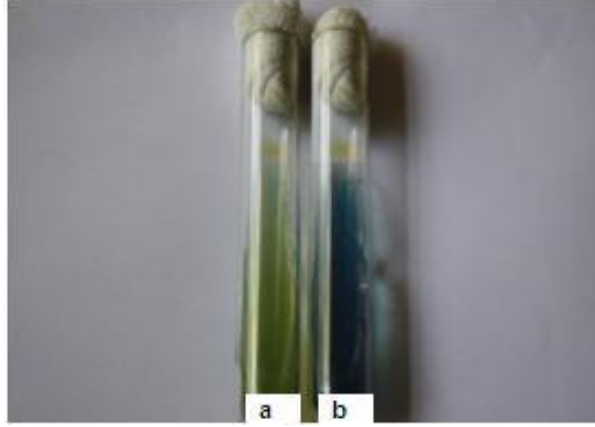
Şekil 3.5. Metil-kırmızısı testi sonuçları (a; metil-kırmızısı negatif-*Pseudomonas*, b; metil-kırmızısı pozitif) (<http://www.blinn.edu>).

#### 3.3.1.4. Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer testi, glukoz bulunan ortamda, glukozun pirüvik aside metabolize olmasından sonra alternatif bir yol olarak bütanediol fermentasyonunu sonucunda asetoin ve bunun nötral redüksiyon ürünü olan 2,3-bütanediol ürünlerinin oluşumunu belirleyebilmek amacıyla uygulanmaktadır. Voges Proskauer testi ile metil kırmızısı testi, ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanabilirler. Metil kırmızı testinde kullanılan glukoz fosfatlı besiyerine, test edilecek *Pseudomonas* suşları inoküle edildi 37°C' de 48 saat inübasyona tabii tutuldu. İnübasyon sonrası üzerine 5 ml %40' lık potasyum hidroksit (KOH) solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı. Böylece ortamdaki asetoin ve 2,3-bütanediol diasetile okside oldu. Bunun üzerine çok az miktarda  $\alpha$ -naftol çözeltisi damlatıldı.  $\alpha$ -naftol çözeltisi ;  $\alpha$ -naftol 5 g; alkol (%96) 100 ml bileşimindedir. 15 dakika içinde üst kısımda pembeden parlak kırmızıya kadar değişen renk oluşumu pozitif, sarı renk ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Mahon and Manuselis, 2000). Test sonucunda *Pseudomonas* suşlarında sarı renk oluşmu gözlendi ve Voges-Proskauer testi negatif olarak değerlendirildi.

### 3.3.1.5. Sitrat Testi

Bu test, bakterinin sitratı kullanıp kullanmadığını belirlemek amacı ile yapılır. Buna bağlı olarak sitratın karbon kaynağı olarak kullanılması halinde besiyerinin pH' sı yükselir ve bu durum pH indikatörü aracılığı ile belirlenir. pH indikatörü brom timol mavisidir. Çalışmamızda kullandığımız Simmons sitrat agar besiyeri distile su içinde eritilip, pH' sı 7.0' a ayarlanarak deney tüplerine dağıtıldı ve otoklavda sterilize edildi. Test edilecek *Pseudomonas* suşları besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyondan sonra besiyeri renginin maviye dönüşmesi ve üreme gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilirken, besiyeri rengi değişmemişse sonuç negatiftir. Test sonucunda *Pseudomonas* suşlarında mavi renk oluşmu gözlendi ve sitrat testi pozitif olarak değerlendirildi (Koneman et al.,1997; Mikrobiyoloji, 2009) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Sitrat testi sonuçları (a; sitrat negatif, b; sitrat pozitif-*Pseudomonas*).

### 3.3.2. TSI (Triple Sugar Iron-Üç Demirli Şeker) Testi

TSI testi mikroorganizmaların glukoz , laktoz ve sukrozun fermentasyonları ve aynı zamanda hidrojen sülfid oluşturmalarını gözlemek amacıyla uygulanır. Karbonhidratlar bakteri tarafından fermente edildiğinde asit oluşumu fenol kırmızısı indikatörü ile gözlenir. Besiyeri bileşimindeki sodyum tiyosülfatın indirgenmesi ile oluşan hidrojen sülfid ferröz amonyum tuzları ile reaksiyona girerek, besiyerinde demir sülfid oluşumundan dolayı siyah renk meydana gelir (Forbes et al., 2002). TSI besiyeri 65,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip, deney tüplerine dağıtıldı ve otoklavda 110°C' de 25 dakika sterilize edildi (Mikrobiyoloji, 2009). Test edilecek *Pseudomonas* suşları besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C' de 24

saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda, eğer tüpün yüzey kısmı kırmızı dip kısmı sarı ise sadece glukozu, tüp tamamen sarı renge dönmüş ise bütün şekerleri fermente edebildiği, tüpün rengi değişmeyip kırmızı kaldıysa hiçbir şekeri fermente edilemediği anlaşıldı. Test sonucunda *Pseudomonas* suşlarının besiyeri bileşimindeki hiçbir şekeri fermentasyon yolu ile parçalayamadığı için tüpün tamamen kırmızı renkte kaldığı aynı zamanda H<sub>2</sub>S ve gaz oluşumlarının gerçekleşmediği gözlemlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *Pseudomonas* suşlarının TSI besiyerindeki negatif test sonucu

### 3.3.3. Üre Hidrolizi Testi

Bu test mikroorganizmanın üreyi hidroliz eden üreaz enziminin varlığını saptamak amacıyla yapılır. Ürenin hidrolizi sonucunda amonyak ve CO<sub>2</sub> oluşur. Amonyak oluşumu ile besiyeri alkali hale gelir ve pH' nın artışına bağlı olarak besiyeri bileşimindeki fenol kırmızısı indikatörünün rengi kırmızı-pembeye döner (Forbes et al., 2002). Çalışmada kullanılan Christensen üreli besiyeri bileşimindeki üre yüksek sıcaklıklarda parçalandığından 100 ml distile su içinde çözüldü ve milipor filtre ile sterilize edildi. Diğer bileşikler ise distile su içinde çözüldü, pH' sı 7.0' a ayarlanarak ve otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışında besiyeri 50°C' ye kadar soğutuldu ve 100 ml steril üreli çözeltiliye eklenip iyice karıştırıldı ve steril deney tüplerine dağıtıldı (Condalab, 2009). Test edilecek *Pseudomonas* suşları besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda *Pseudomonas* suşlarının tüpte pembe renk oluşturmaları üreaz pozitif olarak kabul edilirken tüpte renk değişikliği olmaması üreaz negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.8).



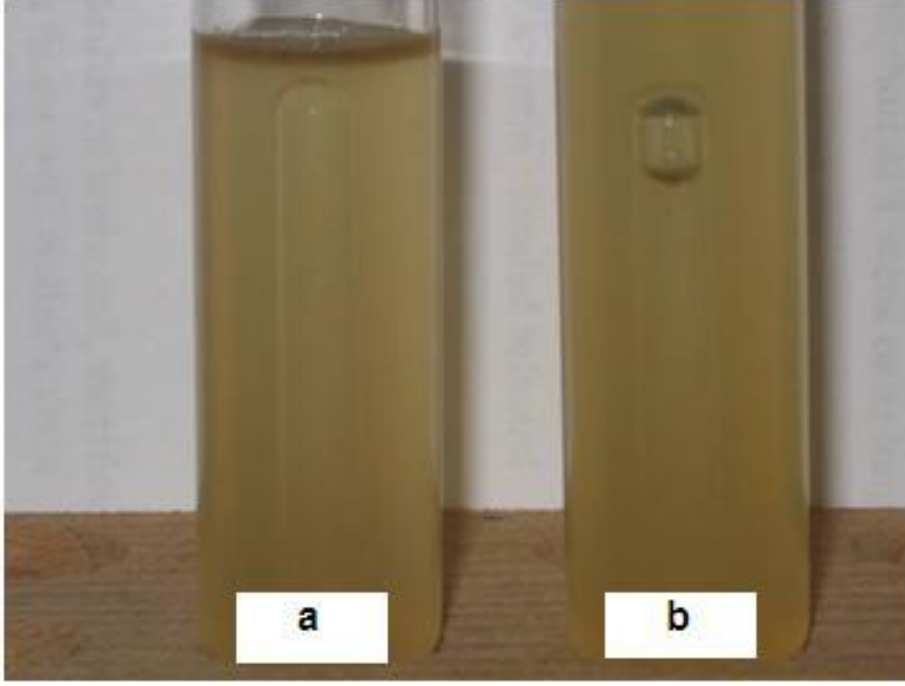


Şekil 3.8. Üre testi sonuçları (a; üre negatif-*Pseudomonas*, b; üre pozitif-*Pseudomonas*) (picasa.google.com).

#### 3.3.4. Nitrat Redüksiyonu Testi

Nitrat redüksiyonu testi bakterinin nitratı redükte edebilme yeteneğini ortaya koymak amacıyla uygulanmaktadır. Bazı mikroorganizmalar nitratları ( $\text{NO}_3$ ) redükte ederek nitrite ( $\text{NO}_2$ ) ve hatta daha ileri basamaklara amonyak ( $\text{NH}_3$ ) veya azot gazına ( $\text{N}_2$ ) kadar indirgeyebilir. Bu test aynı zamanda mikroorganizmaların türlerini ayırt etmede büyük önem taşır. İçinde Durham tüpleri bulunan nitratlı besiyeri otoklavda  $121^\circ\text{C}$ ' de 15 dakika sterilize edildi. Test edilecek *Pseudomonas* suşları nitratlı besiyerine inoküle edildi ve  $37^\circ\text{C}$ ' de 24 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda tüplere A ayırıcı (sulfanilik asit %0.8) ve B ayırıcından (alfa naftilamin % 0.5). 1' er mL damlatıldı. Tüpler iyice karıştırıldı (Mikrobiyoloji, 2009). Test sonucunda nitrat nitrite indirgendiği için kırmızı renk oluşumu yada Durham tüplerinde gaz görüldü ve test sonucu *Pseudomonas* için pozitif değerlendirildi. Ancak renk oluşumu olmadığında, ya nitratın hiçbir ürüne indirgenmediği yada nitratın nitrite indirgenme aşamasından sonra amonyak veya azot gazı safhalarına ulaşmış olabileceği düşünüldü. Bu

nedenle tüplere çok az miktarda (15-20 mg) çinko tozu ilave edildi ve iyice karıştırıldı ve kırmızı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi. Ancak kırmızı renk oluşmaması nitratın nitritten daha sonraki safhalara redükte olduğunu gösterdiği için test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Mahon and Manuselis, 2000) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Nitrat testi sonuçları (a; nitrat negatif, b; nitrat pozitif (azot gazı)-*Pseudomonas*) (<http://www.blinn.edu>).

### 3.3.5. Oksidaz Testi

Bu test mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler bir enzim olan oksidaz enziminin varlığını ortaya koymak amacıyla yapılır. Oksidaz reaksiyonu aerobik bakterilerde sitokrom c oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade eder. *Pseudomonas*' da oksidaz varlığını test etmek amacıyla hazırlanmış kanlı agar kültürlerinden tek bir koloni alındı ve steril filtre kağıdına konuldu, üzerine %1' lik N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine ayıracından 1-2 damla damlatıldı. 10-30 saniye içerisinde kolonilerin mor renk alması oksidaz pozitif olarak değerlendirilirken herhangi bir renk değişikliğinin olmaması oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Forbes et al., 2002) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Oksidaz testi sonuçları (a; oksidaz negatif, b; oksidaz pozitif- *Pseudomonas*).

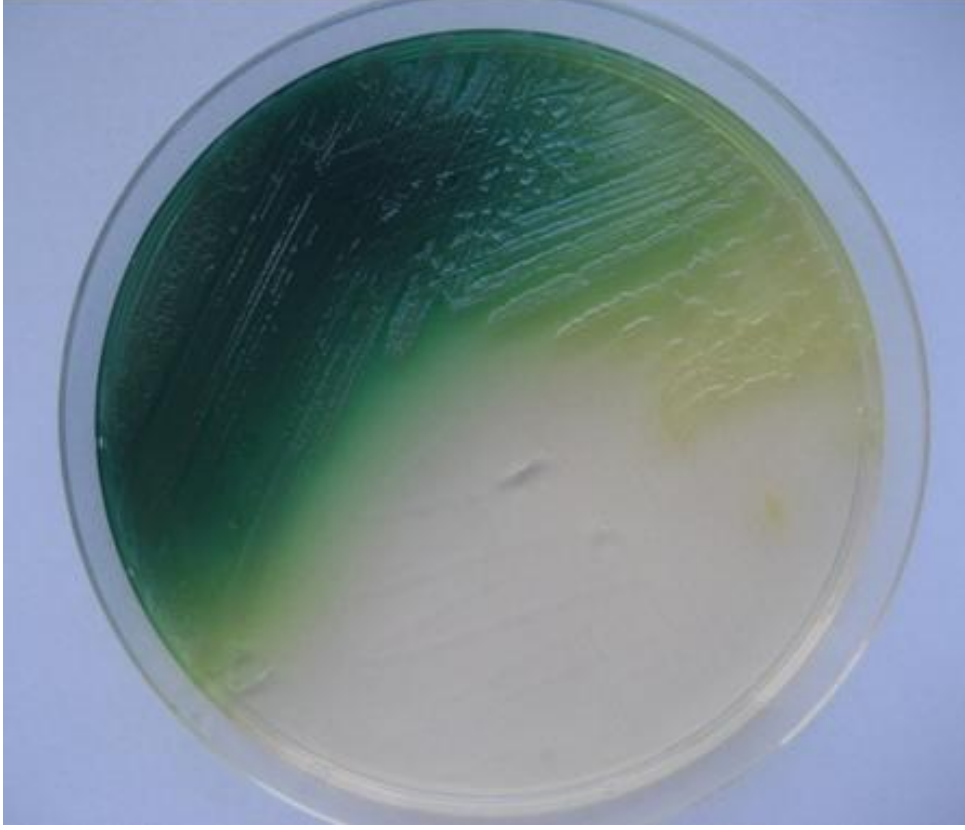
### 3.3.6. 42°C' de Üreme Testi

Bu test mikroorganizmanın 42°C' de üreme yeteneğini belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Böylece *P. aeruginosa* suşlarının diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt edilmesi sağlanır. Hazırlanmış nutrient agar besiyerine inoküle edilen *Pseudomonas* suşları 42°C' de 24 saat inübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda üreme gösteren tüpler için test sonucu pozitif kabul edilirken üreme olmayan tüpler için test sonucu negatif olarak değerlendirildi (Forbes et al., 2002).

### 3.4. Ceftrimide agar ile *Pseudomonas aeruginosa'* nın Tanımlanması

Ceftrimide agar *Pseudomonas aeruginosa'* nın izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılan seçici ve ayırt edici bir besiyedir. Besiyeri bileşiminde bulunan ceftrimide, diğer mikrobiyal floranın üremesini inhibe eder. *P.aeruginosa* sarı-yeşil ya da sarı-kahverengi piyoverdin pigmenti üretir ve bu pigment suda çözünebilir piyosiyenin pigmenti ile birleşince *P. aeruginosa'* ya özgü açık yeşil renk oluşur (Brown and Lowbury, 1965). Besiyeri bileşimi 45.3 g/ 990mL şeklindedir ve 10 mL gliserol eklenir. Besiyeri bileşimindeki jelatinden pepton; nitrojen, vitamin, mineral ve amino asit ihtiyacını karşılarken, magnezyum klorid ve potasyum sülfat piyosiyenin ve piyoverdin pigmentinin üretimini artırır. Besiyerine eklenen gliserol ise bakterilerce karbon kaynağı olarak kullanılır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C

de 15 dakika sterilize edildi ve steril petri plaklarına döküldü. Uygun koşullarda *P. aeruginosa* suşlarının inokülasyonu gerçekleştirildi ve 37°C' de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *P. aeruginosa* kolonileri sarı-yeşil ya da yeşil-mavi renkte görüldü ve UV lambası ile floresan ışımaya verdi (Mikrobiyoloji, 2010) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. ile *Pseudomonas aeruginosa*'nın Cetrimide agardaki görüntüsü

### 3.5. Tür Düzeyinde Tanımlanan *Pseudomonas* Suşlarının Uygun Koşullarda Saklanması

Tür düzeyinde tanımlanan *Pseudomonas* suşları öncelikle % 10 gliserol içeren Brain-Heart İnfüzyon sıvı besiyerine inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürler -20°C' de saklandı ve her ay tüm suşların pasajları yapıldı. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere, tanımlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşları nutrient agar besiyerine inoküle edildi ve 37°C' de 24 saat inkübasyonu bırakıldı ve inkübasyon sonunda +4°C' de muhafaza edildi.

### 3.6. Antibiyotipleme

#### 3.6.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

*P. aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Bu yöntemde *P. aeruginosa* suşları Brain Heart İnfüzyonu sıvı besiyerine inoküle edildi ve 18-24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bakteri kültürleri 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı ve steril eküvyon ile Mueller-Hinton Agara inoküle edildi. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra çalışmamız kapsamındaki antibiyotik diskleri, merkezleri arasındaki ve petrinin kenarına olan uzaklıkları yaklaşık 25 mm olacak şekilde yerleştirilerek 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülerek, duyarlılık, orta derece duyarlılık ve dirençlilik durumları CLSI kriterlerine göre zon tablosundaki değerlerle karşılaştırılarak değerlendirildi (CLSI, 2005).

Çalışmamız kapsamında Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Tetrasiklin antibiyotik diskleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içerikleri ve zon çapları

Antibiyotik Adı	Kodu	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)		
			R	I	S
Amikasin	AK	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Aztreonam	ATM	30 µg	≤ 15	16-21	≥ 22
İmipenem	IM	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16
Meropenem	MEM	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16
Piperasilin	PRL	10 µg	≤ 17	-	≥ 18
Seftazidim	CAZ	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Sefepim	FEB	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Siprofloksasin	CIP	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Tetrasiklin	TE	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Tobramisin	TOB	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Trimetoprim-Sulfametoksazol	TMP-SXT	1.25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

R: Resistant (dirençli); I: Intermediate (orta derece duyarlı); S: Sensitive (duyarlı)

### 3.6.2. Antibiyotiplerin Belirlenmesi

Antibiyotiplerin belirlenmesi amacıyla *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık paternleri esas alınır. Bu amaçla çalışmada kullanılan Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Tetrasiklin için uygulanan test sonuçlarıyla elde edilen paternler karşılaştırıldı. Aynı paterni gösteren izolatlar aynı numarayla belirtilen antibiyotik grubuna dahil edilirken, farklı antibiyotik paterni gösteren izolatlar farklı numaralarla gösterilen farklı antibiyotik gruplarına dahil edildi. Elde edilen antibiyotiplerin çalışmamızdaki tüm örnekler içerisindeki oranı hesaplandı.

$$X \text{ antibiyotipinin oranı} = \frac{\text{Toplam örnek sayısı}}{X \text{ antibiyotipini gösteren örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.6.3. Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Belirlenmesi

Antibiyotiklere direnç oranları antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre değerlendirildi. *P.aeruginosa* suşlarının çalışmamız kapsamında kullanılan Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfometaksazol, Tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç oranları hesaplandı.

$$\text{Antibiyotiğe direnç oranı} = \frac{\text{Antibiyotiğe Dirençli Örnek Sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.7. *P.aeruginosa* Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda farklı hastanelerden toplanan *P. aeruginosa* suşlarının, izole edildikleri klinik materyallere (KM) göre dağılım oranları belirlendi.

$$\text{KM' lere göre dağılım oranı} = \frac{\text{KM'den izole edilen örnek}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.8. *P.aeruginosa* Suşlarının Hastanelerdeki Servislere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda farklı hastanelerden toplanan *P. aeruginosa* suşlarının, toplandıkları hastanelerdeki servislere (S) göre dağılım oranları belirlendi.

$$\text{S' lere göre dağılım oranı} = \frac{\text{Servisten izole edilen örnek}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.9. *P.aeruginosa* Suşlarının İzole Edildikleri Hastaların Cinsiyetine Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda farklı hastanelerden toplanan *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği hastaların cinsiyetleri (C) kadın ve erkek olarak gruplandırıldı ve buna göre dağılım oranları belirlendi.

$$\text{C' lere göre dağılım oranı} = \frac{\text{X cinsiyetindeki hastadan alınan örnek}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.10. Metallo-beta-laktamazların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması

Fenotipik ve genotipik testlerde pozitif kontrol suşları olarak daha önce MBL ürettiği belirlenmiş *P. aeruginosa* suşları kullanıldı. Metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan bu pozitif kontrol suşlarının DNA sekans analizi ile VIM-1 ve VIM-2 tipi MBL enzimi ürettiği bilinmektedir.

### 3.10.1. Metallo-beta-laktamazların Kombine Disk Testi ile Fenotipik Olarak Tanımlanması

*P. aeruginosa* suşlarının 24 saatlik Brain-Heart İnfüzyondaki kültürleri 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandıktan sonra standart disk difüzyon yöntemi ile Mueller-Hinton agara steril eküvyon yardımı ile homojen bir şekilde inokülasyonu gerçekleştirildi. Plak içerisine, diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde 2 tane imipenem (10µg) diski steril pens yardımıyla yerleştirildi. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olduğumuz 0,5 M'lık EDTA solüsyonundan 10 µl otomatik pipetle eklendi. Plaklar 37°C'lik etüvde 18–20 saat inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçüldü. EDTA solüsyonunun eklendiği IMP-EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IMP diski zon çapından  $\geq 7$  mm büyük ise test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Yan et al., 2004; Yong et al., 2002).

**EDTA:** Ticari olarak satılan 186.1 g disodium EDTA.2H<sub>2</sub>O ile 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlandı. Bunun için 9.305 g disodium EDTA.2H<sub>2</sub>O tozu 50 ml'lik steril distile suda çözülerek NaOH ile pH 8.0'e ayarlandı. Hazırlanan EDTA solüsyonu kombine disk testinde MBL inhibitörü olarak kullanıldı.

### 3.10. 2. Metallo-beta-laktamazların Genotipik Olarak Tanımlanması

Fenotipik olarak MBL ürettiği saptanan suşlar genotipik olarak da incelendi. Çalışmada sırasıyla; DNA izolasyonu, *bla<sub>VIM</sub>* geninin korunmuş bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu, elektroforez ile bantların belirlenmesi, jelin görüntülenmesi ve fotoğraflanması aşamaları ile gerçekleştirildi. Bu aşamalar daha ayrıntılı olarak aşağıda alt başlıklar halinde açıklandı.

#### 3.10.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmamızın genotipik analiz aşamasına dahil edilen *P.aeruginosa* suşları 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde hazırlanan steril BHI sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonunda DNA izolasyonu EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic-BioGen) kullanılarak gerçekleştirildi. EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit protokolü aşağıdaki sıra ile gerçekleştirildi.



1. Bakteri yoğunluğu  $10^6$ - $10^7$  civarında olan BHI kültürleri 8 000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 200 µl soğuk Tris-EDTA (TE) tamponundan eklendi.
2. Bu karışıma 400 µl lizis solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Daha sonra 4 µl proteinaz K solüsyonu (2mg/150 µl) eklenerek 55°C' de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra yukarıdaki karışıma 260 µl %100 etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Bu karışımdan 750 µl alınarak spin kolonlara uygulandı ve 8 000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi ve tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
5. 500 µl yıkama solüsyonundan eklenerek 8 000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi ve yine tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
6. Yıkama solüsyonunun kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 1 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
7. EZ-10 spin kolon 1.5 ml' lik steril ependorf tüplerine yerleştirildi. Kolondaki membranın tam merkezine 60 µl elüsyon solüsyonu eklendi ve 50°C' de 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyondan sonra son aşama olarak 10 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elde edilmiş oldu.

### **3.10.2. 2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Elde edilen DNA örnekleri bu basamakta hedef olarak kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonunda *bla<sub>VIM</sub>* genine özgü bir primer çifti kullanıldı. *bla<sub>VIM</sub>* geni için primer çifti; F (5'AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3') ve *bla<sub>VIM</sub>* R ( 5'- ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3') şeklindedir ve bu primerler 261 bp' lik ürün elde edilmesini sağlamaktadır. Tüplerdeki son hacim 50 µl olacak şekilde uygun miktarlar belirlendi ve bu karışım Çizelge 3. 2' deki gibi hazırlandı (Tsakris et al., 2000). Hazırlanan reaksiyon karışımını içeren tüpler otomatik thermocycler (Biometra) cihazına konularak uygun PCR programına tabii tutuldu (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 2. PCR karışım içeriği ve konsantrasyonları

PCR Karışımı	Stok konsantrasyon	1 örnek için miktar (µl)
10x PCR tamponu	1.5 ml	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	20mM/1.5 ml	4 µl
dNTP	100mM/0.25 ml	4 µl
Primer F	25.7 nmol/ 257 µl	3 µl
Primer R	25.8 nmol/ 258 µl	3 µl
Taq DNA polimeraz	100 U/20 µl	0.6 µl
Steril distile su	-	25.4 µl
Hedef DNA	-	5 µl
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMİ</b>	-	50 µl

Çizelge 3. 3. PCR Döngüsü

Ön denatürasyon	94°C	5 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	} 30 Döngü
Primer Birleşmesi	57°C	45 saniye	
Polimerizasyon	72°C	55 saniye	
Son Polimerizasyon	72°C	6 dakika	

### 3.10.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile PCR Ürünlerinin Analizi

PCR ürünlerinin analizi için öncelikle % 1.5' lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için pH' sı 8.3' e ayarlanmış 100 ml 1xTBE tamponunda ( Tris-Borik Asit-EDTA; 10xTBE: 0.9M Tris-Base, 0.9M Borik Asit, 0.02M EDTA) 1.5 gr agaroz eritildi. 40-50°C' ye soğutulduktan sonra 12 µl etidyum bromür eklendi. Uygun genişlikteki taraklar elektroforez tankına yerleştirildikten sonra jel döküldü. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve 1xTBE çözeltisi tanka eklendi. Ürünlerin ve pozitif kontrollerin her birinden 10 µl' lik miktarlar 5 µl' lik yükleme tamponu (% 0.05 Bromfenol mavisi, % 0.05 Ksilen Siyanol, % 36 Gliserol, 30mM EDTA, Takara) ile

karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa da 5 µl 1 kb DNA ladder yüklendi. 90 V'da 60 dakika yürütüldü. Oluşan bantlar UV transilluminatörde incelendi ve daha sonra Gel Logic 200 Molecular Imaging System (Kodak, Rochester) ile görüntüledi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Agoraz jele örneklerin yüklenmesi

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Çalışmamızda Ankara'da bulunan üç farklı hastanenin farklı servis ve klinik materyallerinden elde edilen suşlar kullanıldı. Hastane 1' den 50, Hastane 2' den 27 ve Hastane 3' den 13 olmak üzere toplam 90 *P. aeruginosa* suşu fenotipik yöntemlerle tanımlandı. Öncelikle EMB agar ve MacConkey agarda laktoz fermentasyonu ve kanlı agarda beta-hemolizi incelenerek, koloni morfolojilerine, Gram negatif kokobasil görünümüne ve suşa özgü üzüm kokusuna göre ayırt edildi. Biyokimyasal testlerden sırasıyla IMVC testleri, TSI testi, üre testi, nitrat redüksiyonu testi, oksidaz testi ve 42°C' de üreme testi uygulandı. Sonuçta *Pseudomonas* için, indol testi , metil kırmızısı testi, voges-prokauer testi ve TSI testi negatif sonuç verirken, sitrat testi, nitrat redüksiyonu testi pozitif sonuç verdi. Bunlara ilave olarak Enterik bakteri grubundan ayırt edilmesini sağlayan en önemli test olan oksidaz testi ve *P. aeruginosa*' yı diğer *Pseudomonas*' lardan ayırt edilmesini sağlayan 42°C' de üreme testi pozitif sonuç verdi. Biyokimyasal testlerden sadece üre testi *Pseudomonas* suşları arasında değişkenlik gösterdi. *P.aeruginosa*' nın izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılan seçici ve ayırt edici bir besiyeri olan Cetrimide agar kullanılarak, sarı-yeşil yada yeşil-mavi renkteki koloniler *P. aeruginosa*' nın tanımlanmasında son aşama oldu. Tanımlanan *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyaller, hastaların cinsiyeti ve suşlar arasında değişkenlik gösteren üreaz testi sonuçları Çizelge 4.1' de görülmektedir.

Çizelge 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyaller ve hastaların cinsiyeti ile üreaz testi sonuçları

İzolat Numarası	Servis	Klinik Materyal	Cinsiyet	Üreaz Testi
G1	Üroloji Servisi	İdrar	F	+
G2	Genel Yoğun Bakım Servisi	ETA	F	+

G3	Kulak Burun Boğaz	Yara Yeri	E	+
G4	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	E	+

+: Üreaz pozitif; -: Üreaz negatif; E: Erkek

Çizelge 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyal ve hastaların cinsiyeti ile üre testi sonuçları (devam).

izolat Numarası	Servis	Klinik Materyal	Cinsiyet	Üreaz Testi
G5	Genel Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G6	Genel Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G7	Göğüs Hastalıkları Servisi	Balgam K.	E	+
G8	Kulak Burun Boğaz	Yara Yeri	E	+
G9	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	-
G10	Genel Yoğun Bakım Servisi.	Yara Yeri	E	+
G11	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	+
G12	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	+
G13	Genel Cerrahi Servisi	İdrar	E	+
G14	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	K	+
G15	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	ETA	K	+
G16	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	-
G17	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	+
G18	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G19	Göğüs Hastalıkları Servisi	Balgam K.	E	+
G20	Üroloji Servisi	İdrar	E	+
G21	Dermatoloji Bölümü	Yara Yeri	K	+
G22	Genel Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	+
G23	Genel Cerrahi Servisi	Püy	E	+
G24	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Gaita	E	-
G25	Plastik Cerrahi Servisi	İdrar	K	-
G26	Genel Cerrahi Servisi.	Püy	K	+
G27	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Doku Biyopsisi	K	+
G28	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	-
G29	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G30	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	E	+
G31	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	+
G32	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G33	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	+
G34	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	-
G35	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	E	+
G36	Üroloji Servisi	İdrar	E	-
G37	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	-
G38	Kulak Burun Boğaz	Püy	E	+
G39	Üroloji Servisi	Gaita	E	+

+: Üreaz pozitif; -: Üreaz negatif; E: Erkek; K: Kadın

Çizelge 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyal ve hastaların cinsiyeti ile üreaz testi sonuçları (devam).

İzolat Numarası	Servis	Klinik Materyal	Cinsiyet	Üreaz Testi
G40	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	Kan	K	+
G41	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	K	+
G42	Dermatoloji Bölümü	Yara Yeri	E	-
G43	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
G44	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	+
G45	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	+
G46	Genel Yoğun Bakım Servisi	Balgam K.	E	+
G47	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	+
G48	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	-
G49	Genel Yoğun Bakım Servisi	ETA	E	+
G50	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	ETA	E	-
M1	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	K	-
M2	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	E	+
M3	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Trakeal Aspirat	K	+
M4	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	+
M5	Genel Yoğun Bakım Servisi	Katater	E	+
M6	Genel Yoğun Bakım Servisi	Trakeal Aspirat	E	-
M7	Genel Yoğun Bakım Servisi	Bronkoalveolar lavaj	E	+
M8	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	+
M9	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	Yara Yeri	K	+
M10	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	-
M11	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	E	+
M12	Kulak Burun Boğaz	Kulak K.	K	+
M13	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	+
M14	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	E	-
M15	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Trak. A.	E	-
M16	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	-
M17	Kalp Damar Cerrahi Servisi	İdrar	K	-
M18	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	Trakeal Aspirat	E	-
M19	Genel Yoğun Bakım Servisi	Trakeal Aspirat	E	+
M20	Genel Yoğun Bakım Servisi	Katater	E	+
M21	Genel Yoğun Bakım Servisi	Trakeal Aspirat	K	+
M22	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Trakeal Aspirat	K	+
M23	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	K	+

+: Üreaz pozitif; -: Üreaz negatif; E: Erkek; K: Kadın

Çizelge 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler, klinik materyal ve hastaların cinsiyeti ile üreaz testi sonuçları (devam).

İzolat Numarası	Servis	Klinik Materyal	Cinsiyet	Üreaz Testi
M24	Dermatoloji Bölümü	Kan	E	+
M25	Kalp Damar Cerrahi Servisi	Trakeal Aspirat	E	+
M26	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	Göz	K	+
M27	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	K	+
E1	Üroloji Servisi	İdrar	E	+
E2	Üroloji Servisi	İdrar	K	+
E3	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	E	+
E4	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	E	+
E5	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	+
E6	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	E	-
E7	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	-
E8	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü	İdrar	K	+
E9	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	E	+
E10	Kulak Burun Boğaz	Yara Yeri	E	-
E11	Genel Yoğun Bakım Servisi	İdrar	E	-
E12	Plastik Cerrahi Servisi	Yara Yeri	K	-
E13	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	Yara Yeri	E	-

+: Üreaz pozitif; -: Üreaz negatif; E: Erkek; K: Kadın

## 4.2. Antibiyotipleme

### 4.2.1. Antibiyotik Duyarlılık Paternlerinin Belirlenmesi ve Antibiyotipleme

*P.aeruginosa* suşlarının çalışmamız kapsamındaki Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Tetrasiklin antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulandı. Sonuçta her bir antibiyotiğe ait zon çapları ölçüldü ve CLSI tarafından önerilen zon tablosuna göre duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi. Böylece her suşa ait antibiyotik paterni belirlendi, aynı paterni gösteren suşlar aynı antibiyotip numarası ile gösterildi (Çizelge 4.2.). Elde edilen antibiyotik paternleri

her hastane için hem ayrı ayrı hemde birlikte bir değerlendirme yapıldı. Antibiyotip sınıflarının oluşturulmasıyla 90 tane *P.aeruginosa* suşunda toplam 20 antibiyotip paterni belirlendi.

Antibiyotikleme sonucunda Hastane 1' de toplam 17 antibiyotip grubu belirlenirken, antibiyotip 9 en yüksek oranda görüldü. Ayrıca Hastane 1' de görülen antibiyotip 1, 8, 10, 11, 13 Hastane 2 ve Hastane 3' de görülmedi (Şekil 4.1). Hastane 2' de ise Hastane 1' e göre daha az sayıda olmak üzere toplam 13 antibiyotip grubu belirlendi. Hastane 2' de en yüksek antibiyotip oranları antibiyotip 3, 18 ve 20' de görülürken, antibiyotip 18 ve 20' ye Hastane 1' de ve antibiyotip 3 ve 20' ye Hastane 3' de rastlanmadı (Şekil 4.2). Diğer hastanelere göre daha az sayıda antibiyotip grubu veren Hastane 3' de ise en yüksek antibiyotip oranı antibiyotip 6' da görüldü (Şekil 4.3). Her üç hastanenin ortalamasına bakıldığında antibiyotip 1,10 ve11' in en düşük düzeyde olduğu görüldü. Tüm *P.aeruginosa* suşlarında, trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, aztreonama orta derece duyarlı ve diğer antibiyotiklere hassas olan antibiyotip 9' un en yüksek oranda antibiyotip paternini verdiği belirlendi (Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve antibiyotip grupları

Suş No	TMP-SXT	TE	ATM	IMP	MEM	CAZ	FEB	AK	PRL	CIP	TOB	Antibiyotip
G1	D	D	D	H	D	H	D	H	H	H	H	Ant1
G2	D	D	D	H	D	D	D	D	D	D	D	Ant 2
G3	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
G4	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	D	Ant 4
G5	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
G6	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
G7	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G8	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
G9	D	D	D	H	H	H	D	H	H	H	H	Ant 7
G10	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 8
G11	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 8
G12	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G13	D	D	D	D	D	H	D	D	H	D	D	Ant14
G14	D	D	D	D	D	H	D	H	D	D	D	Ant10
G15	D	D	D	H	D	D	D	H	D	H	D	Ant11
G16	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9



G17	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-------

Çizelge 4.2. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve antibiyotip sınıfları (devam).

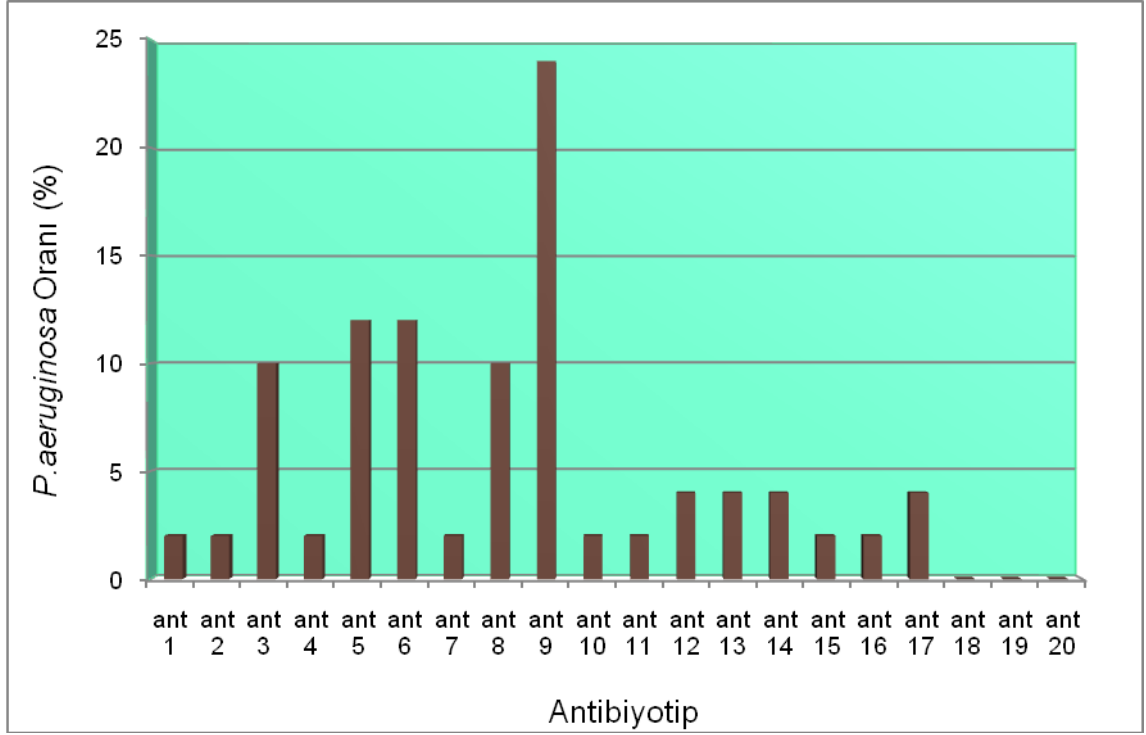
Suş No	TMP-SXT	TE	ATM	IMP	MEM	CAZ	FEB	AK	PRL	CIP	TOB	Antibiyotip
G18	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G19	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 8
G20	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G21	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G22	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G23	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 8
G24	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G25	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G26	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
G27	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G28	D	D	D	D	D	H	D	H	H	D	D	Ant12
G29	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G30	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G31	D	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	Ant13
G32	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G33	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
G34	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G35	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 8
G36	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
G37	D	D	D	D	H	H	H	H	H	H	H	Ant13
G38	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
G39	D	D	D	D	D	H	D	D	H	D	D	Ant14
G40	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G41	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
G42	D	D	D	H	D	H	D	H	H	H	H	Ant15
G43	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G44	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
G45	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	H	Ant16
G46	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
G47	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	D	Ant17
G48	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
G49	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	D	Ant17
G50	D	D	D	D	D	H	D	H	H	D	D	Ant12
M1	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
M2	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	Ant18
M3	D	D	D	D	D	H	D	H	H	D	D	Ant12
M4	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	Ant18
M5	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	H	Ant19
M6	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	H	Ant19
M7	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	D	Ant 4

M8	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	H	Ant16
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-------

Çizelge 4.2. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve antibiyotip sınıfları (devam).

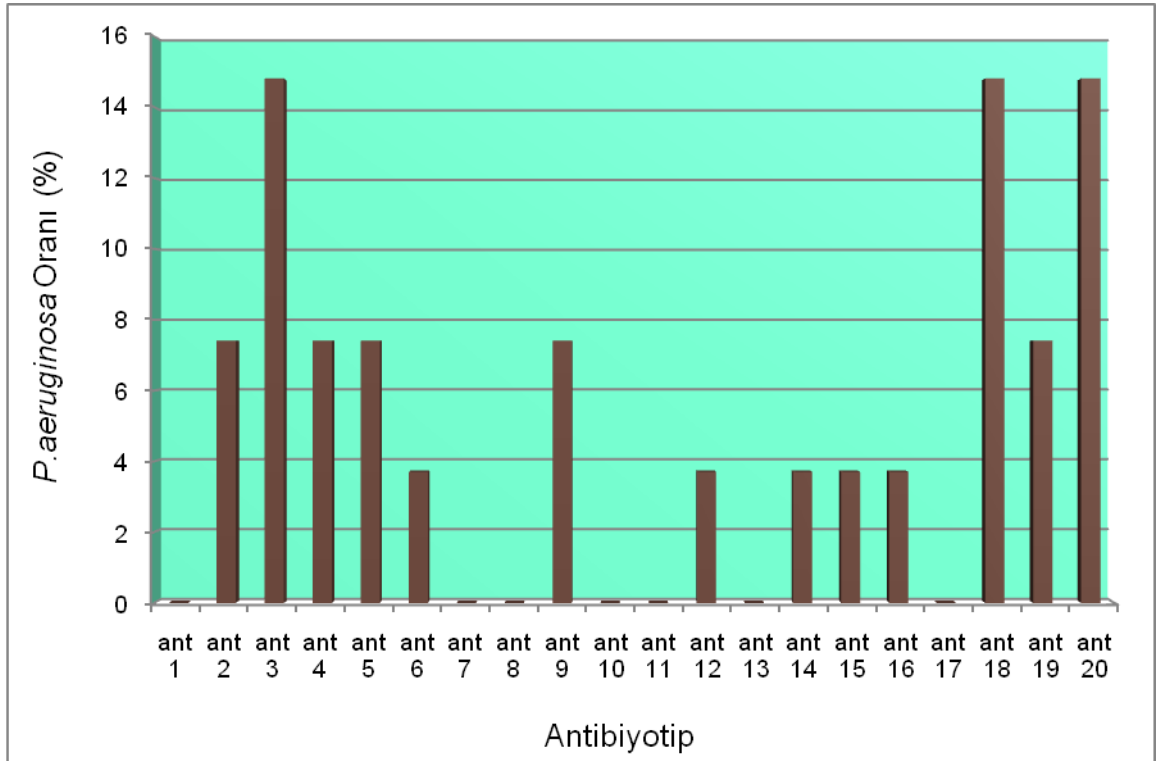
Suş No	TMP-SXT	TE	ATM	IMP	MEM	CAZ	FEB	AK	PRL	CIP	TOB	Antibiyotip
M9	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
M10	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
M11	D	D	D	D	D	H	D	D	H	D	D	Ant14
M12	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
M13	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
M14	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	Ant20
M15	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
M16	D	D	D	D	D	H	D	H	D	D	D	Ant 5
M17	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	Ant18
M18	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	D	Ant 4
M19	D	D	D	H	D	H	D	H	H	H	H	Ant15
M20	D	D	I	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 9
M21	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	Ant18
M22	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	Ant20
M23	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	Ant20
M24	D	D	D	H	D	D	D	D	D	D	D	Ant 2
M25	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	Ant20
M26	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant 3
M27	D	D	D	H	D	D	D	D	D	D	D	Ant 2
E1	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	D	Ant 4
E2	D	D	D	D	D	D	D	H	D	D	D	Ant 4
E3	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
E4	D	D	D	D	D	H	D	H	H	H	D	Ant 5
E5	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	D	Ant17
E6	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	Ant18
E7	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
E8	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	D	Ant17
E9	D	D	D	H	H	H	D	H	H	H	H	Ant 7
E10	D	D	D	D	D	H	D	H	H	D	D	Ant12
E11	D	D	D	H	H	H	D	H	H	H	H	Ant 7
E12	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6
E13	D	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	Ant 6

TMP-SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; ATM: Aztreonam; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; FEB: Sefepim AK: Amikasin; PRL: Piperasilin; CIP: Sipropfloksasin; TOB: Tobramisin; D: Dirençli; H: Hassas; I : Orta Derece duyarlı; Ant: *P.aeruginosa* suşları için antibiyotip patern tipi.



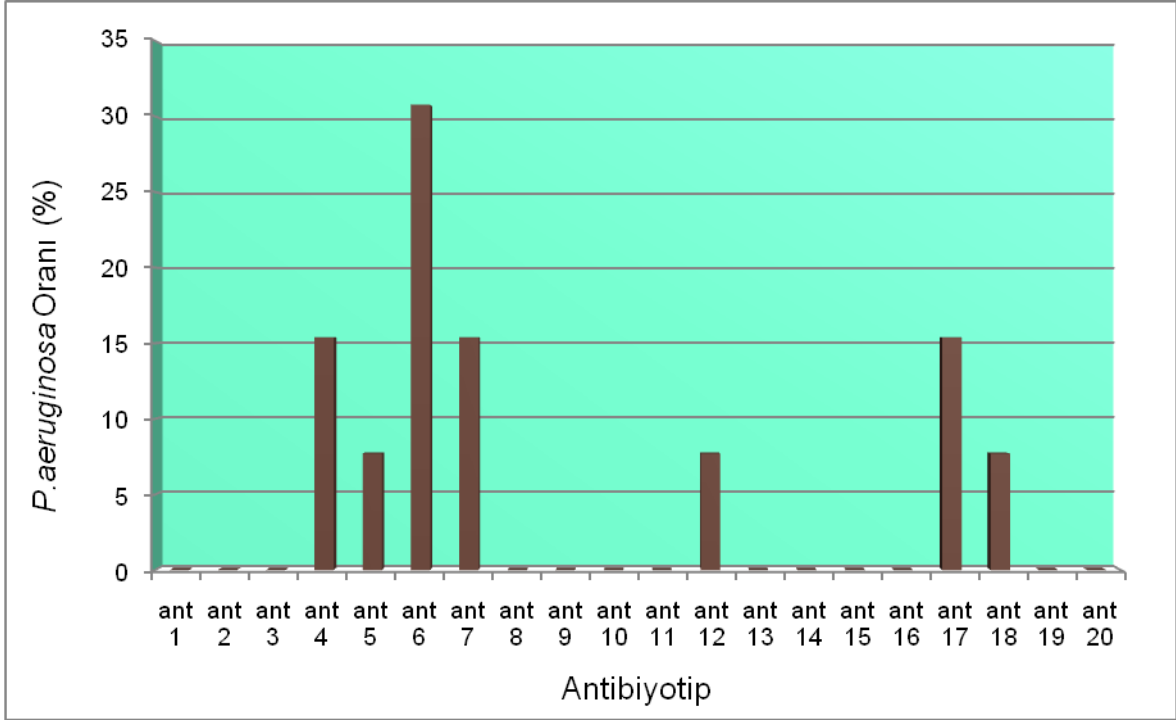
Şekil 4.1. Hastane 1' e ait antibiyotip dağılım oranları

\* Antibiyotiplere göre dağılım Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı



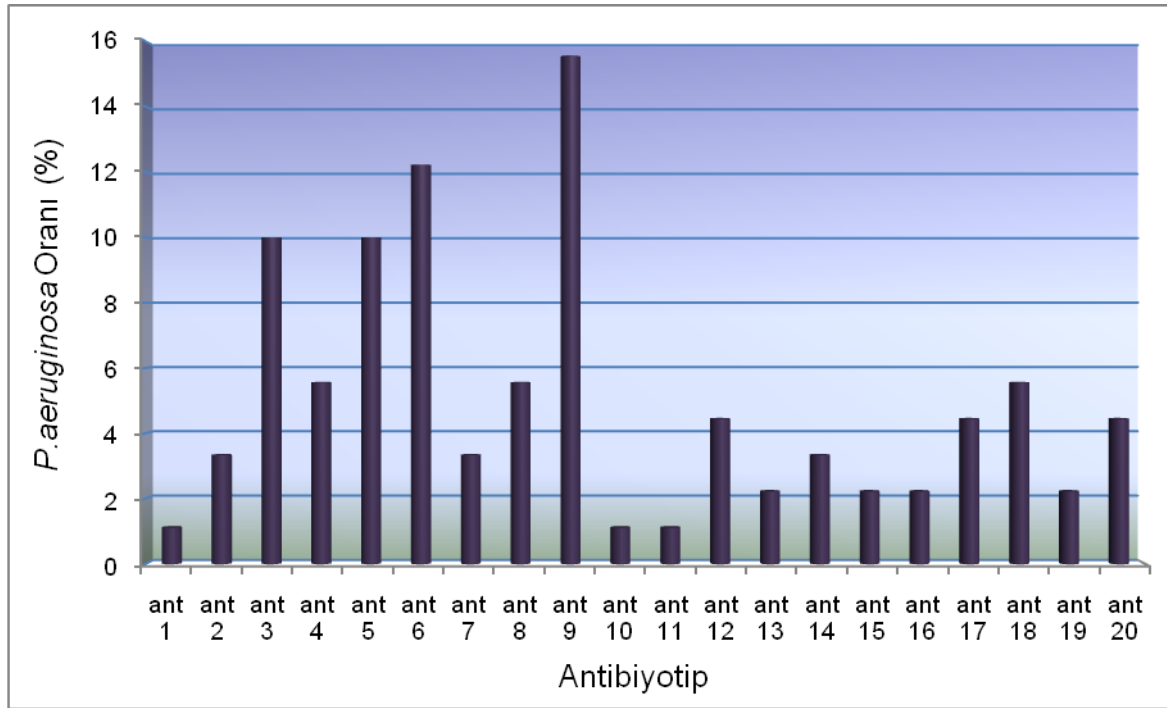
Şekil 4.2. Hastane 2' ye ait antibiyotip dağılım oranları

\* Antibiyotiplere göre dağılım Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Şekil 4.3. Hastane 3' e ait antibiyotip dağılım oranları

\* Antibiyotiplere göre dağılım Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

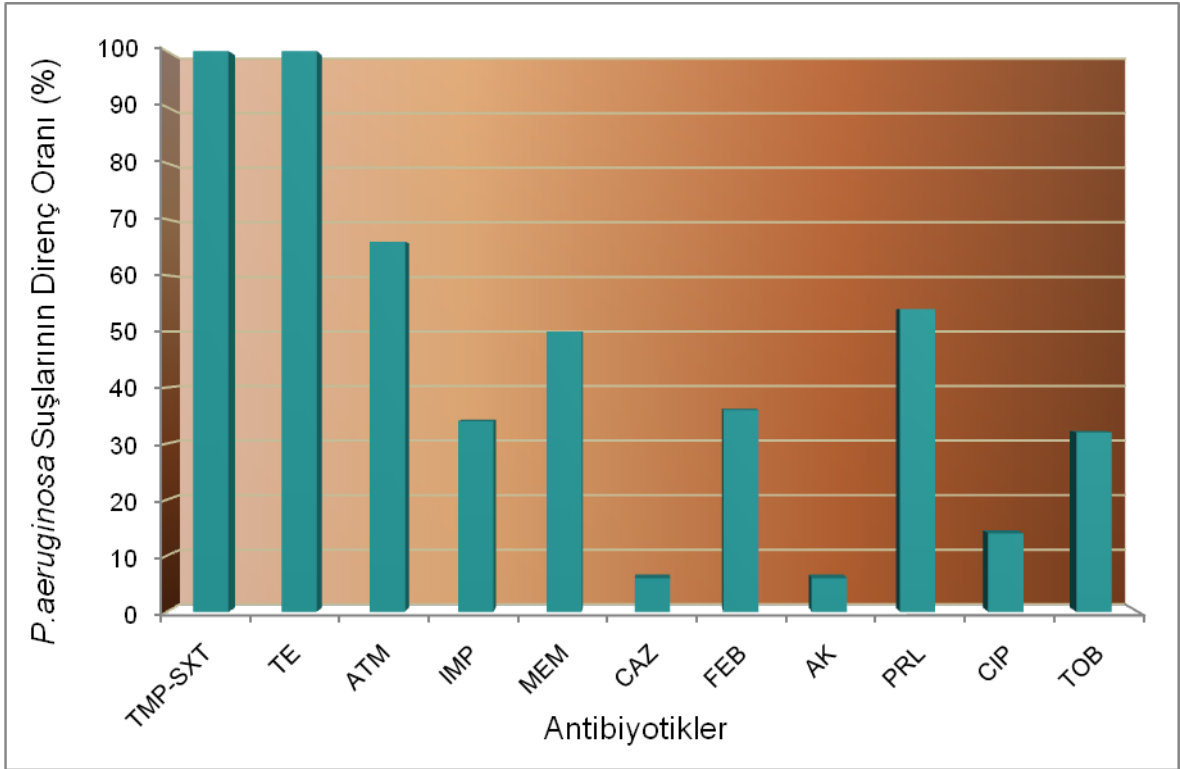


Şekil 4.4. Üç hastaneye ait antibiyotip dağılım oranları

\* Antibiyotiplere göre dağılım Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

#### 4.2.2. Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi

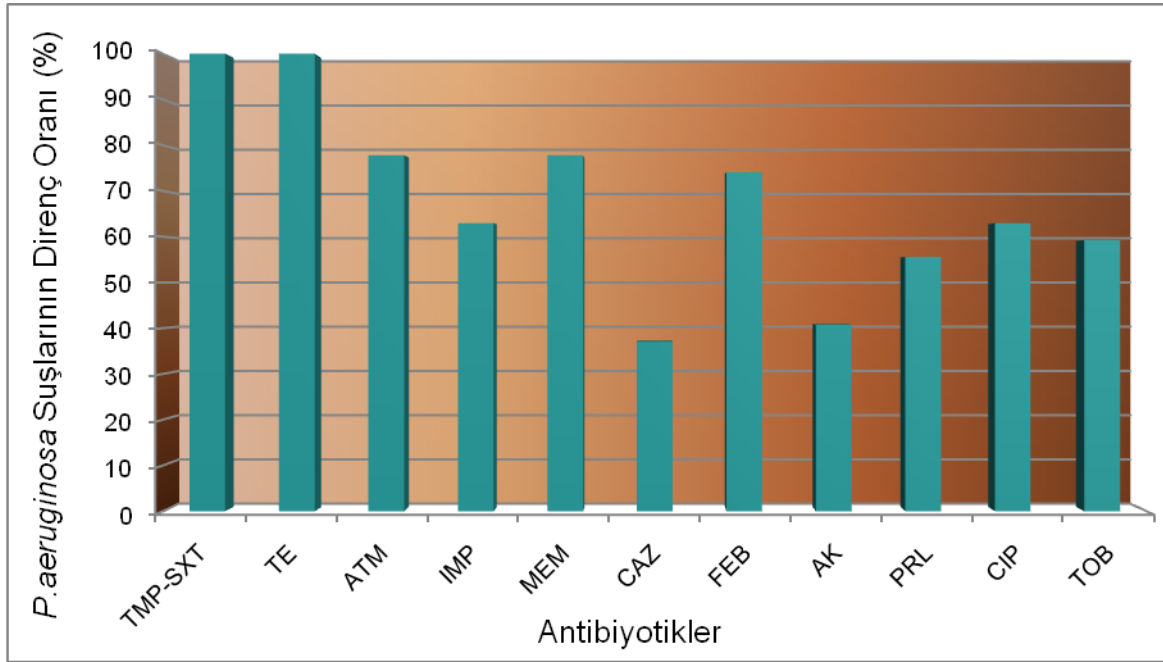
*P. aeruginosa* suşlarının çalışma kapsamında kullanılan antibiyotiklere direnç oranları incelendiğinde, her üç hastanede de tetrasiklin ve trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranının %100 olduğu, aztreonama ise ikinci sırada en yüksek direnç oranı gösterdiği görüldü. Diğer antibiyotikler için, üç hastaneden toplanan *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranlarının benzer olduğu saptanırken, amikasin ve seftazidimin çalışma kapsamındaki 90 *P. aeruginosa* suşuna en etkili antibiyotikler olduğu belirlendi (Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7; Şekil 4.8).



TMP-SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; ATM: Aztreonam; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; FEB: Sefepim AK: Amikasin; PRL: Piperasilin; CIP: Siprofloksasin; TOB: Tobramisin

Şekil 4.5. Hastane 1' e ait antibiyotik direnç oranları

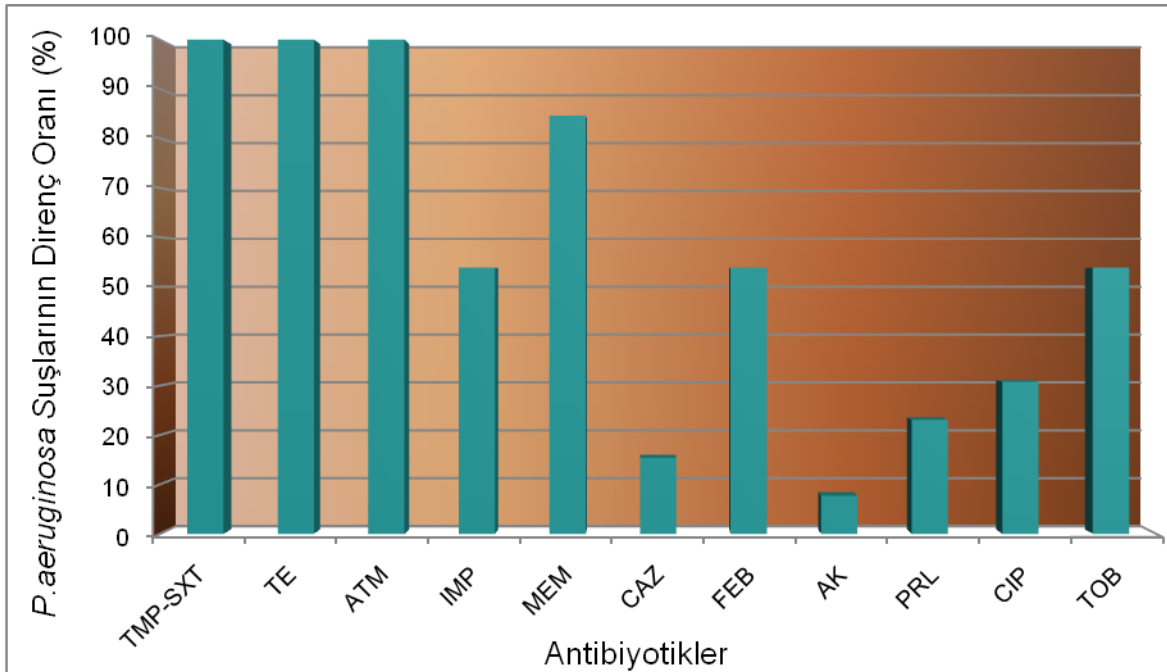
\* Antibiyotik direnç oranları Bölüm 3.6.3' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



TMP-SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; ATM: Aztreonam; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; FEB: Sefepim AK: Amikasin; PRL: Piperasilin; CIP: Siprofloksasin; TOB: Tobramisin

Şekil 4.6. Hastane 2' ye ait antibiyotik direnç oranları

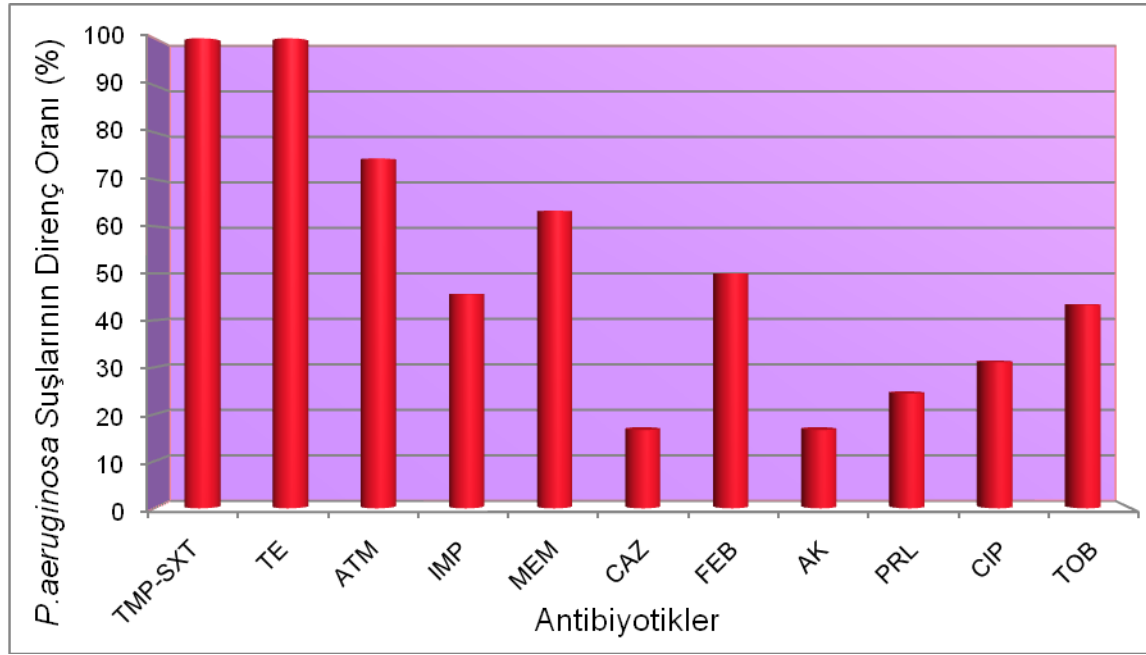
\* Antibiyotik direnç oranları Bölüm 3.6.3' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



TMP-SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; ATM: Aztreonam; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; FEB: Sefepim AK: Amikasin; PRL: Piperasilin; CIP: Siprofloksasin; TOB: Tobramisin

Şekil 4.7. Hastane 3' e ait antibiyotik direnç oranları

\* Antibiyotik direnç oranları Bölüm 3.6.3' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



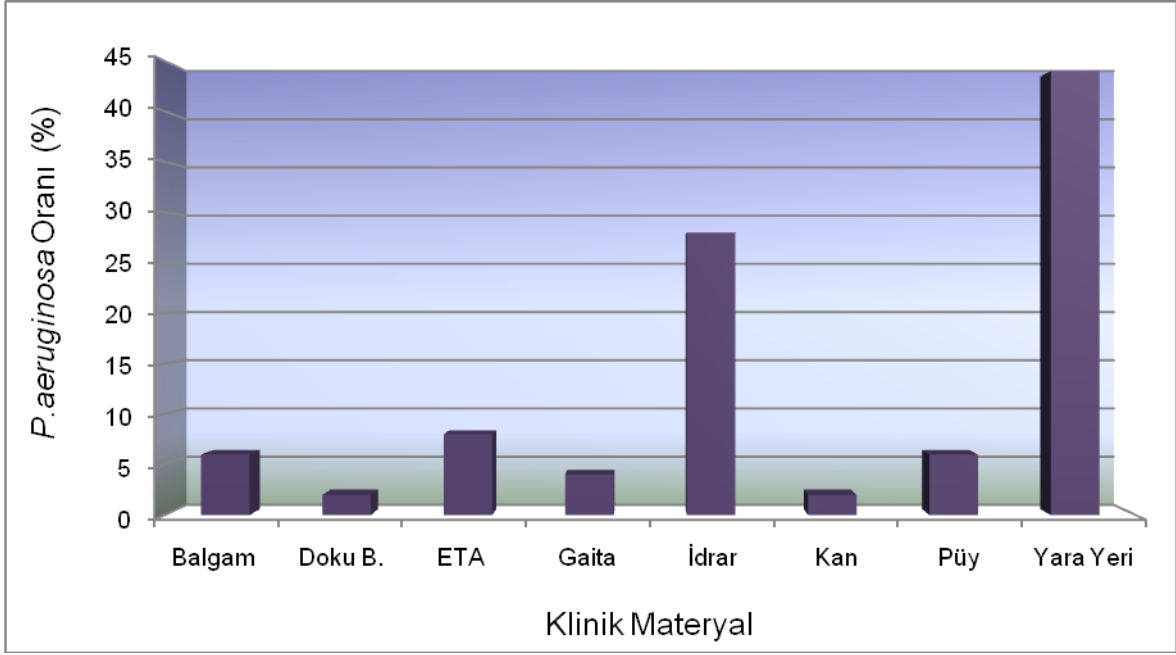
TMP-SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; ATM: Aztreonam; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; FEB: Sefepim AK: Amikasin; PRL: Piperasilin; CIP: Siprofloksasin; TOB: Tobramisin

Şekil 4.8. Üç hastaneye ait toplam antibiyotik direnç oranı

\* Antibiyotiklere göre dağılım Bölüm 3.6.3' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

#### 4.3. *P. aeruginosa* Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

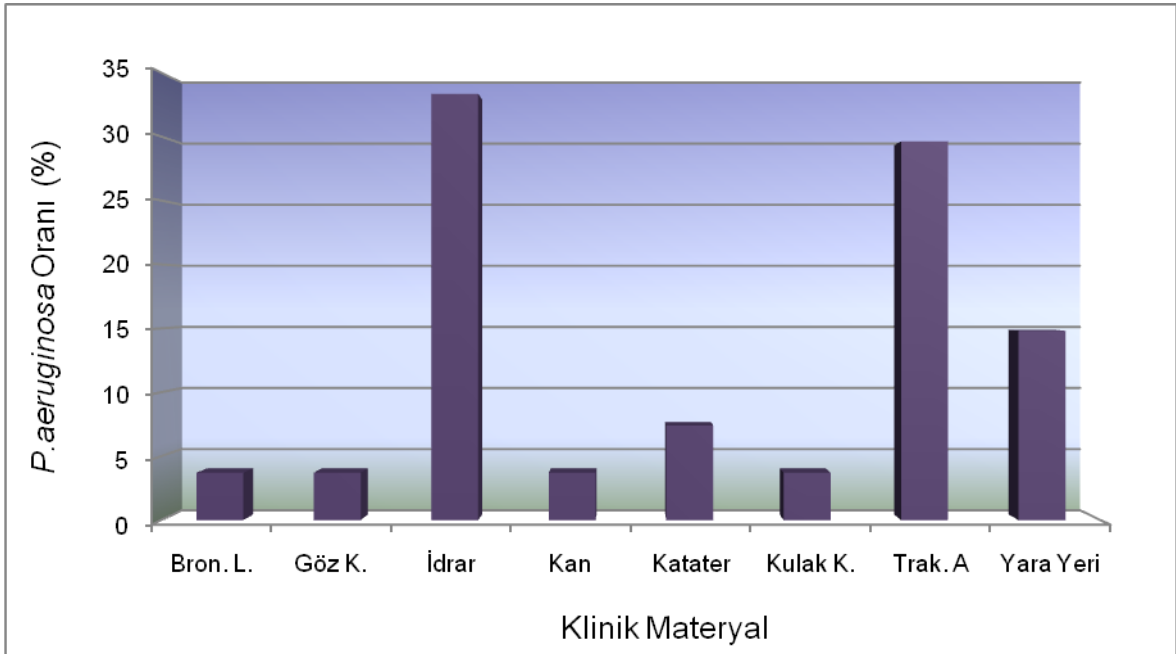
Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının klinik materyallere göre dağılım oranları her üç hastane için ayrı ayrı ve bir arada değerlendirildi. *P. aeruginosa* suşları Hastane 1' de sırasıyla en sık yara yerinden ve idrardan izole edilirken, Hastane 2' de en sık idrar ve trakeal aspirattan izole edildiği görüldü. Ayrıca Hastane 1 ve Hastane 2' de klinik materyaller açısından farklılık olduğu görüldü (Şekil 4.9; Şekil 4.10). Hastane 3' de ise Hastane 1' e benzer şekilde *P. aeruginosa* suşlarının en sık yara yerinden izole edildiği saptandı. Ancak Hastane 3' de diğer iki hastaneye oranla çok az sayıda klinik materyalin olduğu belirlendi (Şekil 4.11). Bütün bu sonuçlara göre bir değerlendirme yapıldığında *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik materyallerden yara yeri ve idrar, her üç hastanede için ortak olduğu ve *P. aeruginosa* suşlarının en yüksek oranda izole edildiği klinik materyalin ise yara yeri olduğu görüldü (Şekil 4.12).



*Balgam K.: Balgam Kültürü, Doku B.: Doku Biyopsisi*

Şekil 4.9. Hastane 1' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı

\* Klinik materyallere göre dağılım oranı Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

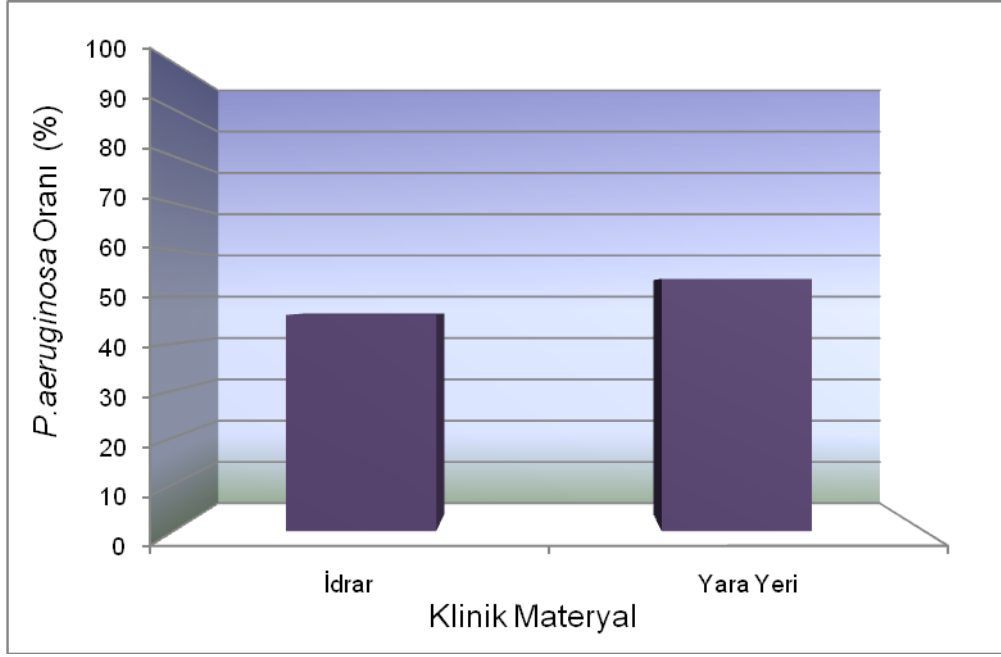


*Bron.L.: Bronkoalveolar Lavaj, Göz K.: Göz Kültürü, Kulak K.: Kulak Kültürü, Trak. A.: Trakeal Aspirat*

Şekil 4.10. Hastane 2' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı

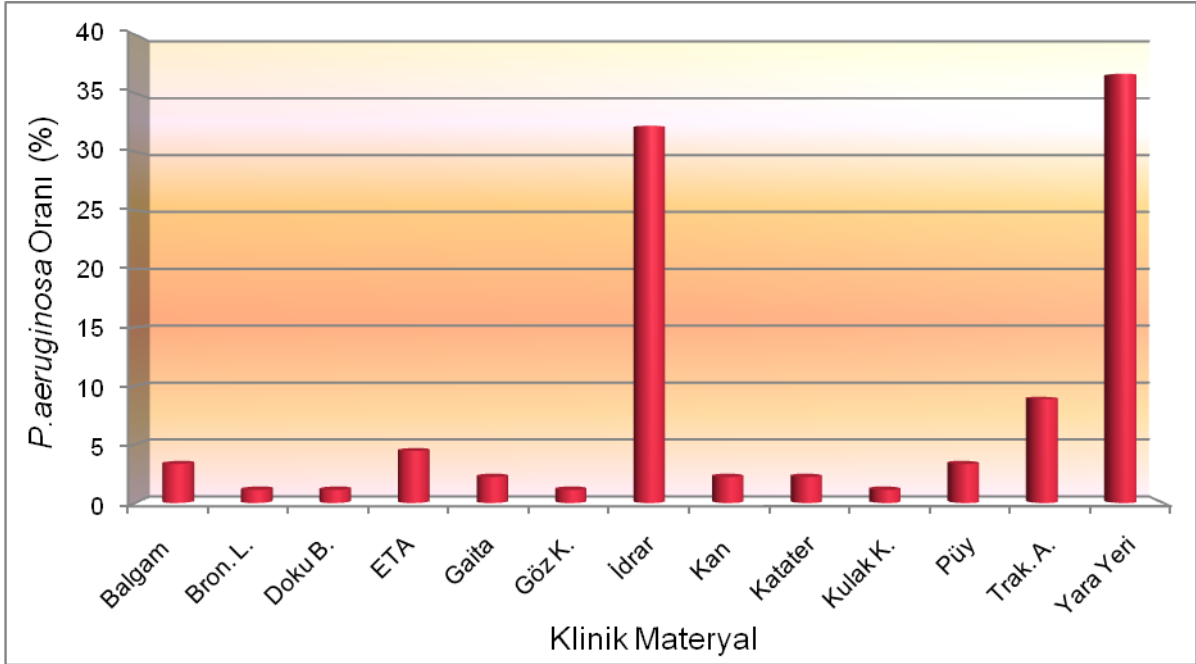
\* Klinik materyallere göre dağılım oranı Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.





Şekil 4.11. Hastane 3' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı

\* Klinik materyallere göre dağılım oranı Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Balgam K.: Balgam Kültürü, Bron. L.: Bronkoalveolar Lavaj, Doku B.: Doku Biyopsisi, ETA K.: ETA Kültürü, G.K.: Gaita Kültürü, İ.K.: İdrar Kültürü, Kan K.: Kan Kültürü, Y.Y.K.: Yara Yeri Kültürü

Şekil 4.12. Tüm hastanelerden elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik materyallere göre dağılım oranı

\* Klinik materyallere göre dağılım oranı Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

#### 4.4. *P. aeruginosa* Suşlarının İzole Edildikleri Servislere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamız kapsamındaki *P. aeruginosa* suşlarının servislere göre dağılım oranları her üç hastane için ayrı ayrı ve bir arada değerlendirildi. *P. aeruginosa* suşları en sık Hastane 1' de çocuk sağlığı ve hastalıkları bölümünde ve daha sonra plastik cerrahi servislerinde görülürken, Hastane 2' de genel yoğun bakım servisinde ve Hastane 3' de plastik cerrahi servislerinde görüldü (Şekil 4.13; Şekil 4.14; Şekil 4.15). Her üç hastanedeki servislere göre dağılım oranları incelendiğinde ise, *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislerin farklı olmasıyla beraber, çocuk sağlığı ve hastalıkları bölümü, genel yoğun bakım servisi, plastik cerrahi servisi ve kulak burun boğazın ortak servisler olduğu görüldü. Bütün *P. aeruginosa* suşları incelendiğinde ise sırasıyla en yüksek oranların yoğun bakım servisinde, çocuk sağlığı ve hastalıkları bölümünde ve plastik cerrahi servislerinde görüldüğü belirlendi (Şekil 4.16).



Ç.S.H.B.: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü; D.B.: Dermatoloji Bölümü; E.H.S.: Efeksiyon Hastalıkları Servisi; G.C.S.: Genel Cerrahi Servisi; G.Y.B.S.: Genel Yoğun Bakım Servisi; G.H.S.: Göğüs Hastalıkları Servisi; K.D.C.S.: Kalp Damar Cerrahi Servisi; K.B.B.: Kulak Burun Boğaz; O.T.S.: Ortopedi ve Travmatoloji Servisi; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi; Ü.S.: Üroloji Servisi

Şekil 4.13. Hastane 1' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı

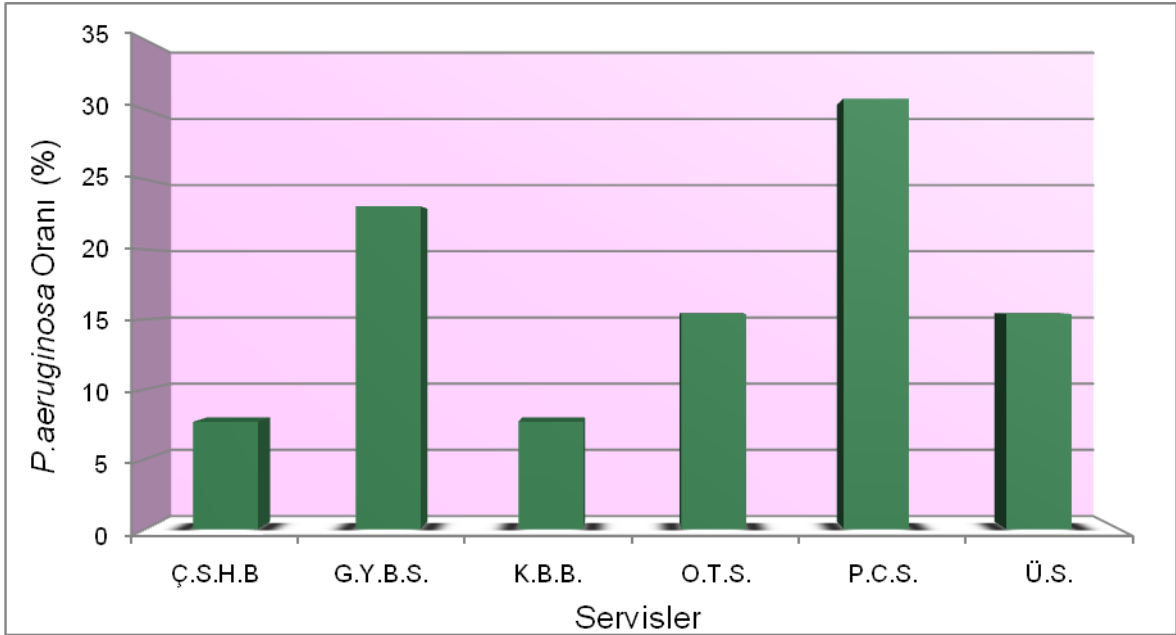
\* Servislere göre dağılım oranı Bölüm 3.8' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Ç.S.H.B.: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü; D.B.: Dermatoloji Bölümü; Genel Yoğun Bakım Servisi; K.D.C.S.: Kalp Damar Cerrahi Servisi; K.B.B.: Kulak Burun Boğaz; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi; Ü.S.: Üroloji Servisi

Şekil 4.14. Hastane 2' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı

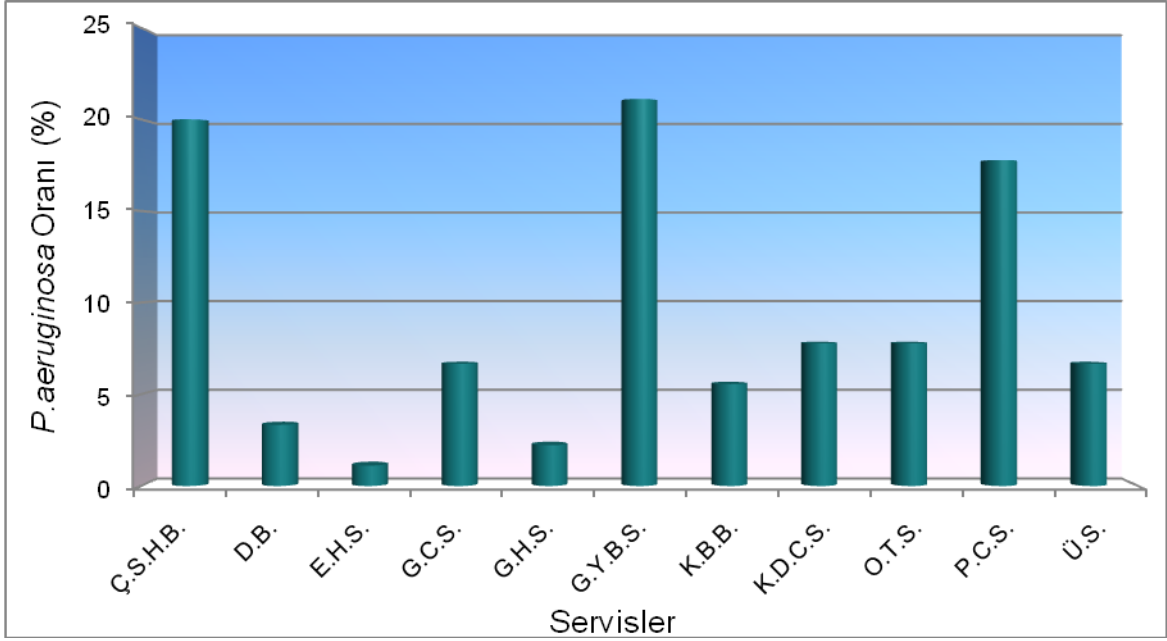
\* Servislere göre dağılım oranı Bölüm 3.8' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Ç.S.H.B.: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü; G.Y.B.S.: Genel Yoğun Bakım Servisi; K.B.B.: Kulak Burun Boğaz; O.T.S.: Ortopedi ve Travmatoloji Servisi; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi; Ü.S.: Üroloji Servisi

Şekil 4.15. Hastane 3' den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı

\* Servislere göre dağılım oranı Bölüm 3.8' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Ç.S.H.B.: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü; D.B.: Dermatoloji Bölümü; E.H.S.: Efeksiyon Hastalıkları Servisi; G.C.S.: Genel Cerrahi Servisi; G.Y.B.S.: Genel Yoğun Bakım Servisi; G.H.S.: Göğüs Hastalıkları Servisi; K.D.C.S.: Kalp Damar Cerrahi Servisi; K.B.B.: Kulak Burun Boğaz; O.T.S.: Ortopedi ve Travmatoloji Servisi; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi; Ü.S.: Üroloji Servisi

Şekil 4.16. Üç hastaneden elde edilen *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislere göre dağılım oranı

\* Servislere göre dağılım oranı Bölüm 3.8' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

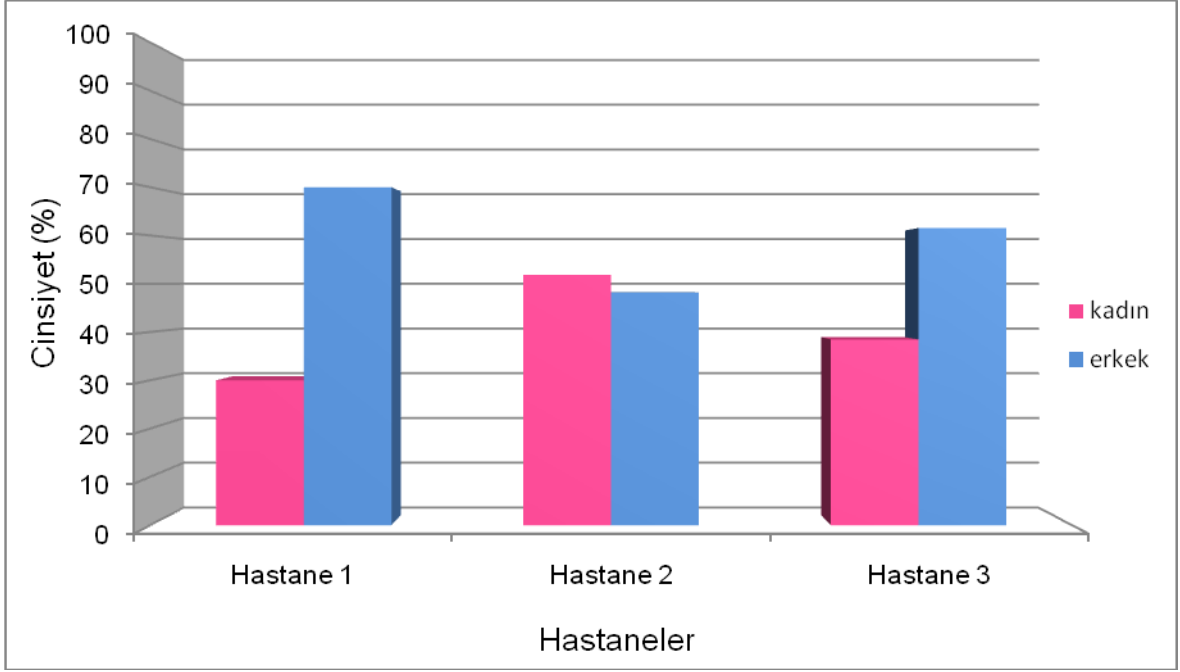
#### 4.5. *P. aeruginosa* Suşlarının İzole Edildikleri Hastaların Cinsiyetine Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

*P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri hastaların cinsiyetlerine göre dağılım oranları belirlendi. Hastane 1 ve 3' deki erkek hasta oranının kadın hasta oranından fazla olduğu saptandı. Ancak Hastane 2' deki erkek hasta oranı ile kadın hasta oranlarının birbirine çok yakın olduğu belirlendi. Ancak bütün hastanelerdeki *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri hastalar göz önünde alındığında, erkek hasta oranının kadın hasta oranından fazla olduğu saptandı (Şekil 4.17.).

#### 4.6. Metallo-Beta-Laktamazların Kombine Disk Testi ile Fenotipik Olarak Belirlenmesi

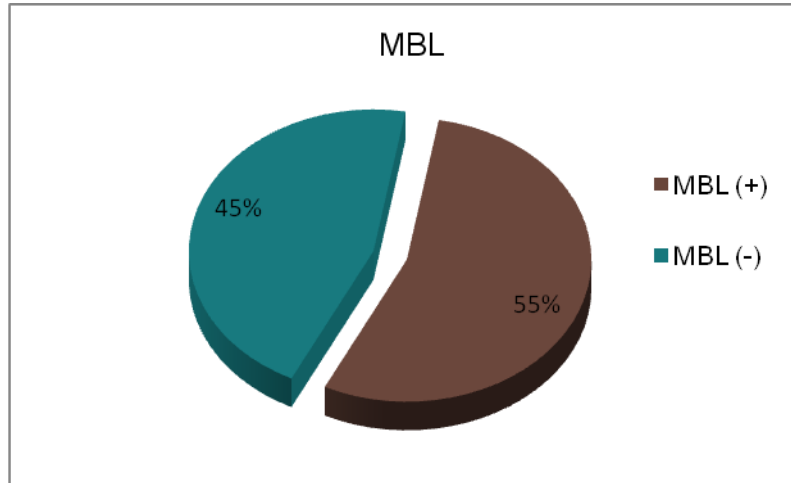
Çalışma kapsamındaki suşlarının antibiyotik direnç oranları ve antibiyotiklerinin belirlenmesinin ardından, imipenem ve/veya seftazidime dirençli 44 *P. aeruginosa* suşunda MBL enziminin varlığı fenotipik olarak araştırıldı. Bunun için de kombine

disk testi uygulandı ve bu testin sonucunda 44 *P. aeruginosa* suşunun 24' ünde MBL enziminin varlığı saptanarak, fenotipik olarak MBL pozitifliğinin %54.5 olduğu saptandı (Çizelge 4.3; Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. Üç hastanedeki *P. aeruginosa* suşlarının elde edildiği hastaların cinsiyetlerine göre dağılım oranları

\* Cinsiyete göre dağılım oranı Bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hesaplandı.



Şekil 4.18. İmipenem ve/veya seftazidime dirençli suşlar arasında kombine disk testi ile MBL enzimi pozitif veren *P. aeruginosa* suşlarının oranı

Çizelge 4.3. Kombine disk testi ile MBL enzimi pozitif olan suşlar

Suş #	MBL	Suş #	MBL	Suş #	MBL	Suş #	MBL	Suş #	MBL
G1		G19		G37	+	M5	+	M23	+
G2		G20		G38		M6		M24	+
G3		G21		G39	+	M7	+	M25	+
G4	+	G22		G40		M8		M26	
G5		G23		G41		M9		M27	+
G6		G24		G42		M10		E1	+
G7		G25		G43		M11		E2	
G8		G26		G44		M12		E3	
G9		G27		G45		M13		E4	+
G10		G28	+	G46		M14	+	E5	
G11		G29		G47		M15		E6	+
G22		G30		G48		M16		E7	
G13	+	G31		G49		M17	+	E8	+
G14		G32		G50	+	M18		E9	
G15		G33		M1	+	M19		E10	+
G16		G34		M2		M20		E11	
G17		G35		M3		M21	+	E12	
G18		G36	+	M4	+	M22	+	E13	

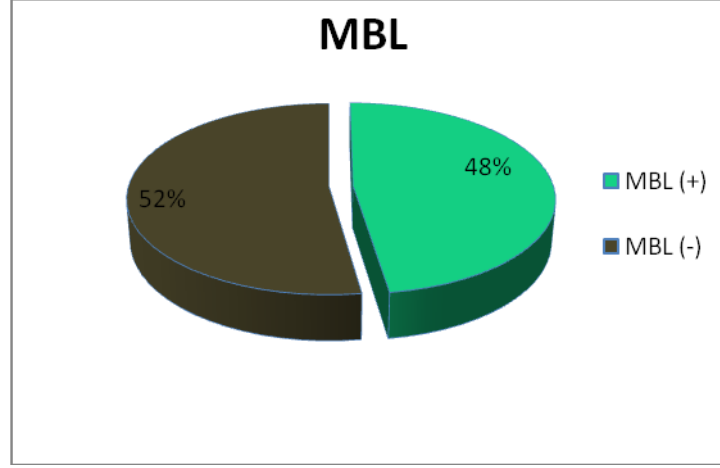
\* Fenotipik olarak MBL pozitif *P. aeruginosa* suşlarının belirlenmesi Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

+: MBL pozitif *P. aeruginosa* suşu; -: MBL negatif *P. aeruginosa* suşu

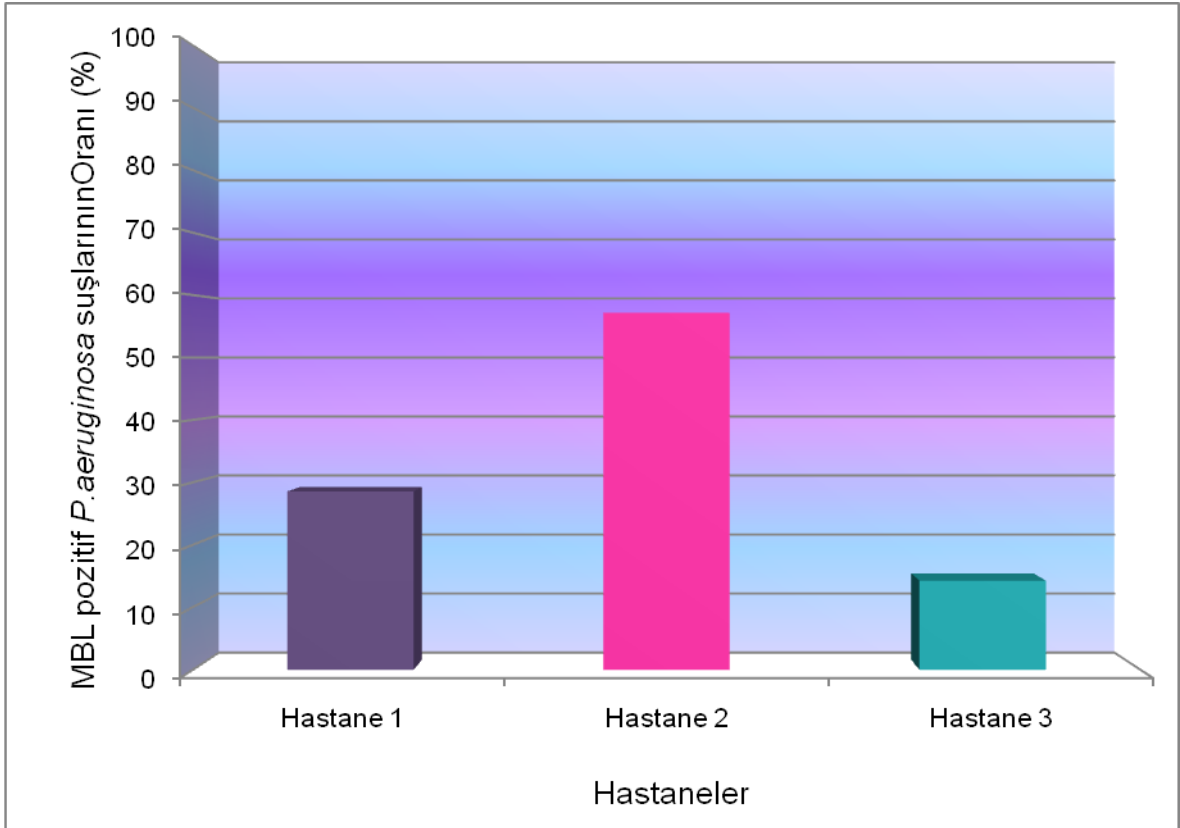
#### 4.7. Metallo-Beta-Laktamazların Genotipik Olarak Belirlenmesi

Kombine disk testine göre MBL enzimi ürettiği varsayılan toplam 24 *P. aeruginosa* suşunda PCR metodu ile *bla<sub>VIM</sub>* genleri araştırıldı. Moleküler inceleme sonucunda toplam 21 örnekte MBL genin varlığı saptanarak, imipenem ve/veya seftazidime dirençli 44 *P. aeruginosa* suşunda MBL sıklığı %48 olarak belirlendi (Şekil 4.19; Şekil 4.20). MBL enzimi ürettiği saptanan 21 *P. aeruginosa* suşunun hastanelere göre dağılım oranları incelendiğinde, en yüksek oranın Hastane 2' de görüldüğü belirlendi (Şekil 4.21). MBL enzimi ürettiği saptanan 21 suşa ait antibiyotip paternleri incelendiğinde ise, Hastane 1' de görülen MBL pozitif *P. aeruginosa* suşlarının sıklıkla antibiyotip 12 ve antibiyotip 14 paternlerini gösterirken, Hastane 2' de saptanan MBL pozitif suşların genellikle toplam 11 antibiyotiğe de direnç gösteren antibiyotip 20 paternini verdiği dikkat çekti. Hastane 3 için genel bir

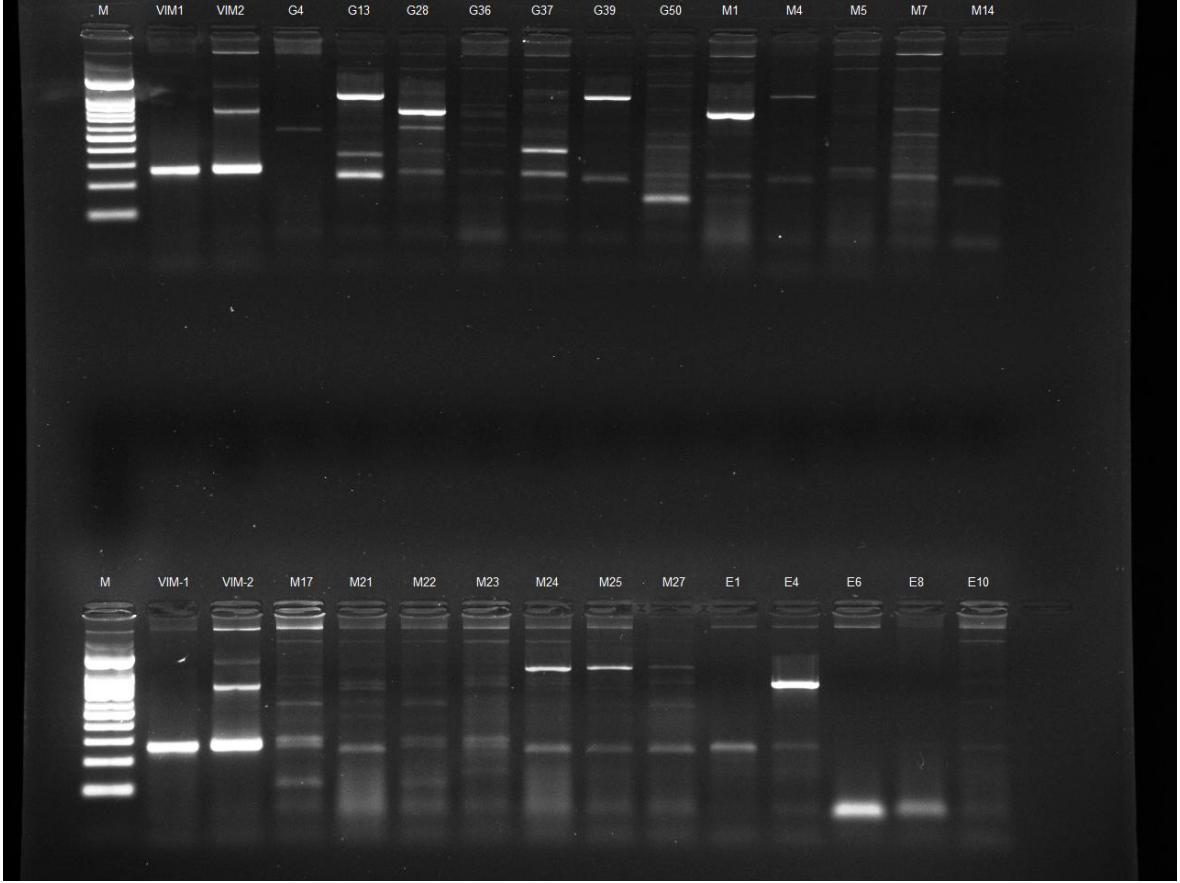
antibiyotip paterni saptanmadı. Ayrıca PCR analizi ile MBL enzimi ürettiği saptanan suşların, izole edildiği servisler ve klinik materyallere göre dağılım oranları belirlendiğinde, en sık genel yoğun bakım servisinden ve idrar örneklerinden izole edildiği belirlendi.



Şekil 4.20. İmipenem ve/veya seftazidime dirençli *P.aeruginosa* suşları arasında *bla<sub>VIM</sub>* geni saptanan suşların oranı



Şekil 4.21. MBL enzimi ürettiği saptanan 21 *P.aeruginosa* suşunun hastanelere göre dağılım oranları



M: Marker; VIM-1: VIM-1 tipi MBL enzimi üreten *P. aeruginosa* suşu; VIM-2: VIM-2 tipi MBL enzimi üreten *P. aeruginosa* suşu; G13-G50: Hastane 1' den izole MBL pozitif *P. aeruginosa* suşları; M1-M27: Hastane 2' den izole MBL pozitif *P. aeruginosa* suşları; E1,E4,E10: Hastane 3' den izole MBL pozitif *P. aeruginosa* suşları.

Şekil 4.19. Fenotipik olarak MBL ürettiği tespit edilen 24 *P. aeruginosa* suşunun PCR analiz sonuçları



## 5. TARTIŞMA

*Pseudomonas* cinsi bakteriler toprakta ve suda yaşayan Gram negatif, nonfermentatif, aerop basillerdir. *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan *P. aeruginosa*, hastane infeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer alan önemli bir patojendir. *P. aeruginosa* hastane infeksiyonlarının da %10-25' inden sorumlu tutulmaktadır. Genellikle üriner sistem ve solunum sisteminde, yara ve yanıklarda, dış kulak yolunda ve gözde infeksiyonlara neden olmakta ve *P.aeruginosa'* nın daha çok immün yetmezliği olanlarda, malign veya metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda, yaşlılarda ve ağır yanıklı hastalarda sıklıkla infeksiyona neden olduğu bilinmektedir (Pollack, 2002; Gül vd., 2004).

*P.aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olması nedeni ile çoklu ilaç direncine sahip bu suşlar ile gelişen enfeksiyonların tedavisi, klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Murray et al., 2002). Birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmasının yanında tedavi sırasında da yüksek oranda direnç geliştirmesi nedeniyle nozokomiyal infeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır (Çıragil vd., 2000). Bu bağlamda tehlikeli ve önemli bir patojen olan *P. aeruginosa* suşları ile mücadele edilmeli ve bu suşları kontrol eden stratejiler geliştirilmelidir.

Çalışmamızda Ankara' daki üç farklı hastanenin farklı servislerinden ve farklı klinik materyallerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, beta-laktam grubunda yer alan karbapenem dirençten sorumlu mekanizmalar arasında birinci sırada yer alan metallo-beta laktamaz enziminin hem fenotipik hemde genotip yöntemlerle tanımlanması ve bu yöntemler arasındaki uyumluluğun belirlenmesi amaçlandı. Bu bağlamda öncelikle hastanelerden elde edilen *Pseudomonas* suşlarının fenotipik teşhisi gerçekleştirildi. Fenotipik teşhis için Öncelikle EMB agar ve MacConkey agarda laktoz fermentasyonu ve kanlı agarda beta-hemolizi incelenerek, koloni morfolojilerine, Gram negatif kokobasil görünümüne ve suşa özgü üzüm kokusuna göre ayırt edildi. Biyokimyasal testlerden sırasıyla IMVC testleri, TSI testi, üre testi, nitrat redüksiyonu testi ayrıca *P. aeruginosa'* nın Enterik bakteri grubundan ayırt edilmesini sağlayan en önemli test olan oksidaz testi ve *P.*

*aeruginosa*' yı diğer *Pseudomonas*' lardan ayırt edilmesini sağlayan 42°C' de üreme testi gerçekleştirildi. Son aşamada, *P.aeruginosa*' nın izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılan, seçici ve ayırt edici bir besiyeri olan Cetrimide agarda sarı-yeşil yada yeşil-mavi renkteki koloniler *P. aeruginosa*' nın varlığını ortaya koydu.

*P. aeruginosa* suşlarının çalışmamız kapsamındaki Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Tetrasiklin olmak üzere 11 antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını belirlendi. CLSI önerilerine uygun olarak üç hastane için birlikte değerlendirme yapılarak, 90 *P. aeruginosa* suşunda toplam 20 antibiyotip paterni belirlendi (Çizelge 4.4). Hastane 1' de toplam 17 antibiyotip grubu belirlenirken, antibiyotip 9 en yüksek oranda görüldü. Ayrıca Hastane 1' de görülen antibiyotip 1, 8, 10, 11, 13 Hastane 2 ve Hastane 3' de görülmedi (Şekil 4.1).

Hastane 2' de Hastane 1' e göre daha az sayıda olmak üzere toplam 13 antibiyotip grubu belirlendi. Hastane 2' de en yüksek antibiyotip oranları antibiyotip 3, 18 ve 20' de görülürken, antibiyotip 18 ve 20' ye Hastane 1' de ve antibiyotip 3 ve 20' ye Hastane 3' de rastlanmadı (Şekil 4.2). Diğer hastanelere göre daha az sayıda antibiyotip grubu veren Hastane 3' de ise en yüksek antibiyotip oranı antibiyotip 6' da görüldü. 2010 yılında yapılan benzer bir çalışmada, üç farklı hastaneden toplanan toplam 39 *P.aeruginosa* suşu ile 9 antibiyotiğe olan direnç profili incelenmiş ve toplam 9 antibiyotip paterni saptanmıştır. Ancak antibiyotip 1, 2 ve 3 sadece hastanede 1'de, antibiyotip 4,5 ve 6 hastane 2' de ve antibiyotip 7, 8 ve 9 hastane 3' de bulunmuştur (Prashanth et al., 2010). Bizim çalışmamızda ise her üç hastanede ortak olan antibiyotip 4, 5, 6, 12, bulundu (Şekil 4.2; Şekil 4.3; Şekil 4.4). Bu da bize Ankara'da farklı hastanelerde benzer profil veren suşların yayılımını işaret etmektedir.

Tüm *P.aeruginosa* suşlarında, trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, aztreonama orta derece duyarlı ve diğer antibiyotiklere hassas olan antibiyotip 9' un en yüksek antibiyotip oranını verdiği antibiyotip 1,10 ve11' in en düşük düzeyde olduğu görüldü (Şekil 4.4). İran' da 2007 yılında yapılan benzer bir çalışmada yara enfeksiyonu ve nozokomiyal pnömoniye sahip hastalardan izole edilen toplam 60 *P.aeruginosa* suşu ile 11 antibiyotiğe olan duyarlılık durumları incelenmiştir. Yara

enfeksiyonuna neden olan 30 *P. aeruginosa* suşunda 11 antibiyotip bulunurken, nozokomiyal pnömoniye neden olan 30 *P. aeruginosa* suşunda 15 farklı antibiyotip saptanmıştır (Kohanteb et al., 2007). Yine 2004 yılında Brezilya’ da yapılan benzer bir çalışmada 81 *P.aeruginosa* suşu ile 7 antibiyotiğe olan duyarlılık profilleri incelenmiş ve toplam 26 antibiyotip saptanmıştır (Freitas and Barth, 2004).

*P.aeruginosa* birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç göstermekte ve bu nedenle etken olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu bakteriler karbapenemler dahil birçok antibiyotiğe karşı hızla çoğul direnç geliştirmektedirler. *P. aeruginosa* suşlarında artan antimikrobiyal ilaç direnci özellikle son yıllarda oldukça dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Antibiyotik direnç durumu hastaneden hastaneye ve hatta kliniklere göre değişiklik gösterebilmektedir (Yücel vd., 2006; Özgenç vd., 2002). Bu nedenle bu çalışmada üç farklı hastanın farklı servislerine ait *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç durumları belirlenerek direnç oranları hem ayrı ayrı hemde toplu halde değerlendirildi. Her üç hastaneye ait direnç oranları incelendiğinde trimetoprim/sulfametoksazole ve tetrasikline %100 direnç gösterdiği ve bütün antibiyotikler değerlendirildiğinde en yüksek direnç oranlarının ise Hastane 2’ den elde edilen *P. aeruginosa* suşlarında olduğu saptandı. *P. aeruginosa* suşlarının her ne kadar trimetoprim/sulfametoksazole doğal direnç olduğu bilinse de, klinik örneklerden izole edilen 51 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada trimetoprim/sulfametoksazole %82.3 direnç saptanmıştır. Bu nedenle trimetoprim/sulfametoksazol çalışmaya dahil edilmiş ve bu sonuç çalışmamız ile uyumluluk göstermiştir (Ekşi vd., 2007).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik beta- laktam grubu antibiyotiklerden olan monolaktam grubuna dahil aztreonamdır. Gayyurhan ve ark. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesi hastalarının çeşitli klinik materyallerinden izole edilen 89 *P. aeruginosa* suşunda %53.93 olarak bulunan aztreonam direnci ile 51 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir başka çalışmada ise %56.9 olarak bulunmuş (Gayyurhan vd., 2008) (Şekil 4.8.). 40 farklı hastaneden toplanan 718 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir başka çalışmada ise aztreonama direnç oranı %55.5 olarak belirlenmiş ve çalışmadaki en yüksek antibiyotik direncini vermiştir (Eldere, 2002). Her üç hastaneye ait *P. aeruginosa* suşlarında

saptadığımız %74.4 oranındaki aztreonam direncinin bu sonuçlarla karşılaştırıldığında artış gösterdiğini belirtebiliriz.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik ise bilinen en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerden biri olan karbapenem grubunda yer alan imipenemdir. Son zamanlarda *P. aeruginosa* suşlarında çeşitli mekanizmalar ile karbapenemlere de direnç kazanılmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda %7 ile %48 oranlarında karbapenemlere direnç geliştiği görülmektedir (Özkalay vd., 2005). Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarında görülen ortalama %45.5 direnç oranı ile ülkemizdeki çalışmalara benzerlik gösterdi. 2009 yılında Erzurum' da yapılan bir benzer çalışmada ise 56 *P. aeruginosa* suşunun 19' unda imipenem direnci saptanmış ve % 34.0 direnç oranı Hastane 1' e ait imipeneme direnç oranı ile paralellik göstermiştir (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.).

Yapılan farklı bir çalışmada 59 *P. aeruginosa* suşunda imipeneme direnç oranı % 18 olarak saptanmıştır (Gayyurhan vd., 2008). Eskişehir' de yapılan bir başka çalışmada, 38 *P. aeruginosa* suşunda imipeneme direnç oranı %48.2 olarak belirlenmiş ve bu sonuç Hastane 2' den izole edilen *P. aeruginosa* suşunda görülen %53.85' lik direnç oranı ile benzerlik göstermiştir (Kiremitçi vd., 2006). Ancak Hastane 3' deki direnç oranlarının en yüksek olması da genel yoğun bakım servisinden izole edilmiş suş sayısının en fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü yoğun bakım ünitelerindeki hastaların dirençli mikroorganizmalarla karşılaşma olasılığının yüksek olması ve ampirik tedaviler, yoğun bakım ünitelerinden antibiyotiklere direnç artışını etkileyen faktörlerdendir (Fridkin and Gaynes, 1999). Ülkemizde 16 farklı merkezi kapsayan bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde *P.aeruginosa* suşlarında %52 oranında imipenem direnci görülmesi, yoğun bakım ünitelerindeki direnç problemini ortaya koyması bakımından önemlidir (Özdemir vd., 2009). Ülkemizden bildirilen çok merkezli bir çalışmada yoğun bakım ünitesinden izole edilen suşlarda bu oran %80' e kadar çıkmaktadır (Ersöz vd., 2004).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik karbapenem grubundan olan meropenemdir. G hastanesinde meropeneme direnç oranı %50, M hastanesinde %77.78, E hastanesinde %84.62 ve toplam direnç %63.33 bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.). Yapılan benzer bir çalışmada 24 *P.aeruginosa*

suşunda meropenem direnci %63.3 olarak bulunmuş ve çalışmamızdaki hastanelere ait toplam *P.aeruginosa* suşlarındaki meropenem direnci ile aynı sonucu vermiştir (Uzun vd., 2006). Mersin’ de yapılan bir başka çalışmada 34 olmak üzere oldukça az sayıda *P.aeruginosa* suşunda bile meropenem direnci %26 olarak bulunmuştur (Ersöz vd., 2004).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik 3. kuşak sefalosporinler grubunda yer alan sefdazidimdir. Konya’ da yapılan bir çalışmada 56 *P. aeruginosa* suşunda sefdazidime direnç oranı %35.7 olarak saptanmıştır (Coşar vd., 2009). Bir başka çalışmada 71 *P. aeruginosa* suşu ile çalışmış ve sonuçta sefdazidime duyarlılık oranı disk diffüzyon yöntemi ile %42.3, E-test yöntemi ile %50.7 bulunmuştur ve bu sonuçlar bizim çalışmamızda Hastane 2’ ye ait sefdazidime direnç oranı ile paralellik göstermiştir (Gül vd., 2004). 271 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir başka çalışmada sefdazidime dirençli 19 suş bulunurken direnç oranı %7 olarak belirlenmiş ve bu sonuç Hastane 1’ e ait %6 direnç oranı ile uyumluluk göstermiştir (Carmeli et al., 1999). Tokat’ da 179 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir başka çalışmada ise sefdazidim direnci %22.9 olarak belirlenmiş olup, Hastane 3’ e ait %15.38 sefdazidim direnç oranı ile paralellik göstermiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda seftazidim direnci %15.2-62 arasında değişiklik göstermektedir. Benzer olarak çalışmamızda her üç hastaneye ait ortalama sefdazidim direnç oranı % 16.8 olarak bulunmuştur. (Tunçoğlu vd., 2009) (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik 4. kuşak sefalosporinler grubunda yer alan sefepimdir. Hastane 1’ den toplanan *P.aeruginosa* suşlarının sefepim direnç oranı %36, Hastane 2’ deki %74 ve Hastane 3’ deki %53.8 bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.). Mehli ve ark. 29 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada sefepim direncini %44.82 olarak bulmuşlardır. Bu da tüm *P.aeruginosa* suşlarındaki sefepim direnci ile benzerlik göstermiştir (Mehli vd., 2007).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik aminoglikozidler grubunda yer alan amikasinidir. Hastane 1’ deki amikasin direnç oranı %6, Hastane 2’ deki %40.7, E hastanesinde %7.69 olarak bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.). Çalışmamıza benzer olarak Ankara’ da çeşitli klinik örneklerden izole edilen 40 *P. aeruginosa* suşunun 7’ sinde amikasin direnci görülmüş ve amikasin direnç oranı

% 18 olarak belirlenmiştir (Fidan vd., 2005). Elde edilen bu sonuç çalışmamız yer alan tüm *P. aeruginosa* suşlarındaki %16.8 amikasin direnci ile oldukça uyumludur. Tunçoğlu ve ark., 179 *P. aeruginosa* suşu ile amikasin direncini %5.6 olarak belirlemişler ve elde edilen bu sonuç Hastane 1 ve 3' e ait amikasin direnç oranları ile benzerlik göstermiştir. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda amikasin direnci %2-34 arasında değişmektedir (Tunçoğlu vd., 2009). Çeşitli ülkelerde yapılan bazı çalışmalarda amikasin direnci; Avrupa'da %9-52 arasında, Amerika'da %4-13 arasında ve Güneydoğu Asya'da %7 oranında bildirilmiştir (Eyigör vd., 2009). Aminoglikozitler arasında amikasin, aminoglikozit modifiye edici enzimlerden daha az etkilendiği için grubun diğer üyelerine kıyasla daha etkindir (Yücel vd., 2006). Bu çalışmada ise *P.aeruginosa* izolatlarına en etkili antibiyotik olarak amikasin ve sefdazidim olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik olan piperasilin, beta laktam grubunun önemli bir kısmını oluşturan penisilinler grubunda yer alır. Hastane 1' deki piperasilin direnç oranı %54, Hastane 2' deki %55.56 , Hastane 3' deki %23.08 ve toplam direnç %24.44 gibi oranlar bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.). Çalışmamıza benzer olarak yapılan bir araştırmada 100 *P. aeruginosa* suşunda %40 oranında piperasilin direnci saptanmış ve bu sonuç G ve M hastanesindeki direnç oranları ile uyumlu bulunmuştur (Durmaz Çetin vd., 2004). Aydın' da 94 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada, bu suşlarda piperasiline direnç oranı %5 gibi oldukça düşük bir oran bulunmuştur (Eyigör vd., 2009).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik olan siprofloksasin ise üçüncü kuşak kinolonlar (fluorokinolonlar) grubunda yer alır. Hastane 1' de siprofloksasin direnç oranı %14, Hastane 2' deki %63, Hastane 3' deki %30.8 ve toplam direnç %31.1 bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.).

Hastane 1' deki sonuçlara benzer olarak yapılan bir araştırmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 92 *P.aeruginosa* suşunda siprofloksasin direnci %9 oranında bulunmuştur (Kireççi ve Sevinç, 2008). Hastane 2' ye ait sonuçlara benzer başka bir çalışmada, Köseoğlu Eser ve ark. 39 *P. aeruginosa* suşu ile %64.1 oranında siprofloksasin direnci saptanmıştır (Köseoğlu Eser vd., 2005). Bu çalışmalara benzer olarak, 56 *P. aeruginosa* suşuna ait direnç oranı %39.2 olarak belirlenmiş ve bu sonuç hem Hastane 3' deki %30.8' lik direnç oranı hemde üç

hastaneyi kapsayan %31.1'lik ortalama direnç oranı ile benzerlik göstermiştir (Aktaş vd., 2009).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik olan tobramisin aminoglikozidler grubunda yer alan bir diğer antibiyotiktir. Hastane 1' deki tobramisin direnci oranı % 32, Hastane 2' deki %59.2, Hastane 3' deki %53.9 ve toplam direnç %43.3 gibi oranlar bulundu (Şekil 4.5.; Şekil 4.6.; Şekil 4.7.; Şekil 4.8.). Zarakolu ve ark. 179 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada tobramisin direncini %35 olarak saptamışlar ve bu direnç oranı ise Hastane 1 ile benzerlik göstermiştir (Zarakolu et al., 2006).

Çalışmamızda üç farklı hastaneden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarına ait yukarıda belirtilen antibiyotik direnç oranları değerlendirildiğinde hastaneler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde ise; gentamisine %16-64, seftazidime %15-38, imipeneme %7-48, aztreonama %12-44, netilmisine %6-42, siprofloksasine %8-62, tobramisine %9-57 ve amikasine %3-43 oranında değişen direnç oranları saptanmıştır (Kireççi ve Sevinç, 2008). 1997-2004 yılları arasında 32 ülkede 120 merkezin katıldığı MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) grubunun yaptığı çalışmada *P.aeruginosa* suşlarında imipeneme %15 - %48, meropeneme %8 - %44, seftazidime %16 - %50, piperasilin-tazobaktama %7 - %37, siprofloksasine %20 - %52, gentamisine %14 - %68 oranında direnç geliştiği görülmüştür (Jones et al., 2005).

*Pseudomonas aeruginosa'* nın dirençli suşlarına en etkili antibiyotiğin seçimi klinik çalışmalarda oldukça önemlidir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve florokinolonların kullanılabileceği, ancak ciddi infeksiyonların tedavisinde aminoglikozidlerin de eklenerek kombine tedavinin yapılabileceği belirtilmektedir. Yani *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde aminoglikozidler kombine tedavinin bir parçası olarak kullanılmakta olup, tek başlarına kullanılmaları önerilmemektedir (Carmeli et al., 1999).

*P. aeruginosa* suşları ile mücadele için izole edildikleri klinik materyaller belirlenmelidir. Bu bağlamda çalışmamız kapsamında kullanılan 90 *P. aeruginosa*

suşunun klinik örnekler göre dağılımı incelendi. Buna göre *P. aeruginosa* suşlarının Hastane 1 ve Hastane 3' de en sık yara yeri örneklerinden izole edilirken Hastane 2' de idrar örneklerinden izole edildiği belirlendi. Üç hastane birlikte incelendiğinde *P. aeruginosa* suşlarının sırasıyla en sık yara yeri, idrar ve trakeal aspirat örneklerinden izole edildiği saptandı. (Şekil 4.9.; Şekil 4.10.; Şekil 4.11.; Şekil 4.12.). Çalışmamıza benzer olarak, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesinde 179 *P.aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* suşlarının sırasıyla en sık yara yeri örneklerinden (%36) ve idrar örneklerinden (%32) izole edildiği belirlenmiştir (Tunçoğlu vd., 2009). Benzer şekilde Gültekin ve ark. çalışmalarında *P.aeruginosa* izolatlarını en sık yara örneklerinden, ikinci sıklıkta idrar örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir (Gültekin vd., 2004). Ocak 2003 ve Haziran 2005 tarihleri arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Hastanesi servislerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 265 farklı *P.aeruginosa* suşunun, izole edildiği klinik örnekler göre dağılımı incelendiğinde trakeal aspirat ve idrar örnekleri %22, yara yeri örnekleri %15 oranında saptanmıştır (Yücel vd., 2006). Elde edilen bu sonuçlar çalışmamız ait sonuçlar ile paralellik göstermiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer olarak, *P.aeruginosa* suşlarının genellikle solunum yolu örnekleri ( trakeal aspirat, balgam, bronkoalveolar lavaj, boğaz salgısı), yara ve idrar örneklerinden izole edildiği belirlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyon kontrol önlemlerinin daha sıkı uygulanması, yoğun bakım ihtiyacı olmayan hastaların en kısa sürede bu ünitelerden çıkarılması, gereksiz ve uzun süreli invaziv girişimlerden kaçınılması, solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonu gelişen hastalara uygulanacak doğru antibiyotik tedavisi ile bu örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının oranı azaltılabilir (Üstün, 2010).

*P. aeruginosa* suşlarının hastanelerdeki yayılımlarının izlenmesi bu suşların kontrol altına alınması için önemlidir. Bu bağlamda çalışmamızda klinik örnekler göre dağılım incelendikten sonra *P. aeruginosa* suşlarının servislere göre dağılımı her üç hastane için ayrı ayrı ve bir arada değerlendirildi. Hastanelerde ki servislere göre dağılım oranları incelendiğinde, *P. aeruginosa* suşları sırasıyla en sık Hastane 1'de çocuk sağlığı ve hastalığı bölümünde ve daha sonra plastik cerrahi servislerinde görülürken, Hastane 2' de genel yoğun bakım servisinde ve Hastane 3' de plastik cerrahi servislerinde görüldü (Şekil 4.13; Şekil 4.14; Şekil 4.15). Her



üç hastane incelendiğinde ise, *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislerde farklılıklar olmasına rağmen, çocuk sağlığı ve hastalıkları servisi, genel yoğun bakım servisi, plastik cerrahi servisi ve kulak burun boğazın her üç hastane için ortak olduğu görüldü (Şekil 4.16). Bozkurt ve ark. 130 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada servislere göre dağılım incelendiğinde, bu suşların çalışmamıza benzer olarak en sık yoğun bakım ünitesinde ve daha sonra çocuk sağlığı ve hastalıkları servisinde olduğu görülmüştür (Bozkurt vd., 2005). Yoğun bakım ünitelerinde, genel durumu kötü ve bilinci kapalı hastaların uzun süre yatması ve bu hastalara sık uygulanan antibiyotik tedavisi, yüksek virülansa sahip fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'nın görülme sıklığında artışa yol açmıştır. Ayrıca yoğun bakım ünitelerinde, mekanik ventilatör uygulamaları, uzun süreli üriner sistem kateterizasyonu ile hasta vücudaki yanık ve yaralar *P. aeruginosa* enfeksiyonları için yüksek risk oluşturmaktadır (Üstün, 2010).

*P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servisler ve klinik materyallere göre dağılım oranlarının belirlenmesinin ardından, bu suşların izole edildiği hastaların cinsiyetlerine göre dağılım oranı da belirlendi. Buna göre bütün *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri hastalar göz önünde alındığında, erkek hasta sayısının kadın hasta sayısından fazla olduğu saptandı (Şekil 4.17). Elazığ' da 150 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada, suşların izole edildiği hastaların %64'ünün erkek %36'ının bayan olduğu saptanmış ve elde edilen bu sonuçlar çalışmamıza benzerlik göstermiştir (Üstün, 2010).

Tüm dünyada ve ülkemizde birçok hastanede çoklu antibiyotik direncine sahip *P. aeruginosa* suşlarının sayısı giderek artmaktadır. *Pseudomonaslar* için çoklu antibiyotik direnci konusunda literatürde pek çok tanımlama bulunmaktadır. bu tanımlamalar oldukça tartışmalıdır. Son zamanlarda yapılan bir tanımlamada *Pseudomonaslara* etkili sefalosporinler, karbapenemler, beta-laktam + beta-laktamaz inhibitörleri, florokinolonlar ve aminoglikozidlerden en az ikisine duyarlılığın azalması olarak kabul edilmiştir (Akalın, 2007; Paterson, 2006). ). Bu tanıma göre bizim çalışmamızda ise 90 *P. aeruginosa* suşununun 46'ında çoklu antibiyotik direnci belirlenmiş ve çoklu antibiyotik direnç oranı %51 olarak saptanmıştır. Ülkemizde 2003-2004 yıllar arasında yapılan çok merkezli iki çalışmada, çalışmamıza paralel olarak *P. aeruginosa* suşlarında çoklu antibiyotik direnç oranının yaklaşık %40 olduğu belirtilmiştir (Gülây, 2005).

*P. aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç kazanma mekanizmaları farklıdır ancak klinikte en sık karşılaşılan direnç beta-laktamaz enzimleri aracılığıyla olmaktadır. Bu direnç *P. aeruginosa* infeksiyonlarında sık kullanılan ajanlardan biri olan beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına neden olur (Fidan vd., 2005). Erzurum’ da 2008 yılında yapılan bir çalışmada Gram negatif bakteriler içinde beta-laktamaz aktivitesi en yüksek *Pseudomonas spp.* bulunmuştur (Güler vd., 2008).

Beta-laktamazların hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları, kromozom veya plazmid kontrolünde olmaları göz önüne alındığında farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır. Bush tarafından önerilen sınıflandırmaya göre; Grup I’ de kromozomal beta-laktamazlardan indüklenebilir özellikle AmpC tipi kromozomal beta laktamazlar, Grup II’ de yer alan TEM ve SHV grubu plazmid aracılı beta-laktamazlar, GSBL özelliğinde TEM, SHV, OXA türevleri ve PER grubu, VEB-1 ve GES-2 beta laktamazlar geniş spektrumlu beta-laktamazlar ve Grup III’de IMP ve VIM tipi metallo-beta-laktamazlar yer alır (Fidan vd., 2005; Yüce 2001., Çeliksöz vd., 2009). Bunlar arasında metallo-beta-laktamazlar son zamanlarda yayılmaya başlamıştır. Özellikle *Pseudomonas* ve diğer Gram negatif nozokomiyal patojenlerde in vitro olarak aztreonam dışında tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek geniş spektrumlu beta-laktam direncine neden olmaktadır. Bu nedenle MBL enzimini üreten suşların belirlenmesi ve yayılımının önlenmesi son derece önemlidir (Lee et al., 2001; Migliavacca et al., 2002).

MBL enzimi üreten suşların erken tanısı enfeksiyonun kontrolünde ve bu suşların yayılımının önlenmesi bakımından oldukça önemli olsada, henüz metallo-beta-laktamaz enzimi tanımlanması için standart bir fenotipik yöntem geliştirilmemiştir. CLSI tarafından standardize edilmemekle birlikte, çift disk sinerji testi, IPM-EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve modifiye Hodge testi fenotipik yöntemlerden bazılarıdır (Aktaş vd., 2009). Ancak Yong ve arkadaşları, 116 *Pseudomonas spp.* ve 23 *Acinetobacter spp.* suşunda kombine disk testi ile suşların çoğunda MBL enzimi ürettiğini göstererek, bu yöntemin rutin laboratuvarlarda MBL taranmasında kullanılabilecek bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Yong et al., 2002).

Metallo-beta-laktamaz enziminin tayininde uygulanan fenotipik testlerin büyük bir kısmı, enzimin EDTA yada 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) gibi metal şelatörleri tarafından inhibisyonu temeline dayanır. Metal şelatör, MBL enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonuna bağlanarak aktif bölgeden çinko iyonunun ayrılmasına neden olur. Bu prensibe dayanan fenotipik testlerden bir tanesi de çalışmamızda uyguladığımız kombine disk testidir. (Lee et al., 2003).

Çalışmamızda uygulanan kombine disk testi sonucunda imipenem ve/veya seftazidime dirençli toplam 44 *P. aeruginosa* suşunun 24' ü pozitif sonuç vermiş ve MBL pozitifliği %54.5 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.18). Ülkemizde MBL tarama çalışmaları kısıtlı olmasına rağmen, çalışmamıza benzer olarak Toraman ve ark. E test yöntemi ile 52 *P. aeruginosa* suşunun 15' inde MBL pozitifliği saptanmış ve bu oran %29 olarak belirlenmiştir (Toraman vd., 2004).

İstanbul' da 2006 yılında yapılan bir çalışmada kombine disk testi ile *Pseudomonas* kökenlerinde %31,1 MBL varlığı tespit edilmiştir (Aşık, 2006). Ankara'da Fidan ve ark. yaptığı bir başka çalışmada 40 *P.aeruginosa* suşunun ikisinde (%5) Modifiye Hodge testi ve çift disk sinerji yöntemiyle MBL varlığı tespit edilmiştir (Fidan vd., 2005).

Çalışmamızda 90 *P.aeruginosa* suşuna ait imipenem direnç oranı %45.6 iken, imipeneme dirençli suşlar arasında MBL ürettiği saptanan suşların oranı %47.5 olarak belirlenmiştir. Lee ve ark., *P.aeruginosa* izolatlarının %11' inin imipeneme dirençli olduğunu ve imipeneme dirençli izolatlar arasında %8.7' sinin MBL ürettiğini göstermişlerdir (Lee et al., 2002). Sonuçlara bakıldığında imipeneme dirençli suş oranı ile dirençli suşlardaki MBL pozitifliği arasında her iki çalışmada da bir paralellik olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın son aşamasında kombine disk testi ile pozitif sonuç veren 24 *P.aeruginosa* suşu genotipik olarak incelenmiş ve uygulanan PCR analizinde *bla<sub>VIM</sub>* geninin korunmuş bölgesine özgü 1 çift primer kullanıldı. PCR analizinde kullanılan primer çifti 261 bp' lik ürün vermekteydi. Yapısal olarak oldukça benzeyen VIM-1 ve VIM-2 sadece amino asit dizisi bakımından %7' lik bir farklılık gösterirken, çalışmamızda kullanılan primer çifti VIM-1 ve VIM-2 enzimlerinin korunmuş bölgelerini esas alarak hazırlanmıştır. PCR analizi sonunda 261 bp

civarında bant veren 21 pozitif suş saptanmıştır (Şekil 4.19). Elde edilen bant profilleri VIM-1 ve VIM-2 enzimlerini taşıdığını bildiğimiz pozitif kontrol suşları kadar parlak olmamıştır.

Çalışmamızda uygulanan fenotipik testin PCR analiziyle doğrulanmasına benzer olarak, Lee ve arkadaşları 2003 yılında, disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarına kombine disk sinerji testi uygulamış ve sonuçları PCR analizi ile doğrulamışlardır (Lee et al., 2003). Yunanistan' da benzer bir çalışmada da 2001 yılında 15 merkezden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının 36' sında *bla<sub>VIM</sub>* geni açısından pozitif bulunurken bunlardan 26' sında 2-MPA ve imipenem kullanılarak uygulanan fenotipik testler ile MBL varlığı gösterilmiştir (Giakkoupi et al., 2003).

MBL enzimi üreten suşların tespitinde kullanılacak uygun yöntemin belirlenebilmesi için MBL enziminin varlığının araştırıldığı yöntemlerin duyarlılığının saptanması önemlidir. Kore' de yapılan bir çalışmada fenotipik olarak pozitif bulunan 29 *P.aeruginosa* suşunda PCR analizi sonucunda, MBL enzime ait gen bölgesi bulunduğu saptanmıştır. Böylece çalışmada uygulanan kombine disk testinin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtmişlerdir (Oh et al., 2003). Yan ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmada ise kombine disk sinerji testinin *P.aeruginosa* suşlarında MBL enziminin fenotipik tanısındaki duyarlılığının %87, özgüllüğünün ise %96.7 olduğunu saptamışlardır (Yan et al., 2004). Çalışmamızda uyguladığımız kombine disk testinin PCR analizi sonucuyla büyük oranda paralellik göstermesi, bu fenotipik yöntemin duyarlılığının yüksek olduğunu ve literatürdeki çalışmalar ile paralel olduğunu göstermektedir.

MBL'ları moleküler düzeyde sınıflandırmak için çok sayıda çalışmalar yapılmış ve oluşturulan filogenetik şema ile sınıf B enzimleri sekans özellikleri ve yapısal özelliklerine göre üç alt sınıfta incelenmiştir. İçinde transfer edilebilir MBL'lar olan IMP, VIM, SPM, SIM ve GIM ailelerinde yer aldığı B1 alt sınıfında en fazla IMP ve VIM tipi enzimler saptanmıştır (Walsh et al., 2005; Luzzaro et al., 2004).

MBL geninin varlığının önemi, hem IMP yada VIM tipi enzimleri kodlayan MBL genlerinin integron üzerinde mobil gen kasetlerinde yer alarak türler arasında hızla

yayılabilme potansiyeli taşınması, hem de karbapenemler dahil olmak üzere bütün beta-laktam antibiyotiklere ve sıklıkla MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yanında aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan genin varlığıyla, aminoglikozitlere direnç geliştirmesidir (Luzzaro et al., 2004). MBL enzimi üreten suşların tanımlanması için yukarıda da belirtilen çalışmalarda olduğu gibi moleküler ve fenotipik yöntemler birlikte kullanılmaktadır (Aktaş vd., 2009; Yan et al., 2004).

Çalışmamızda imipenem ve/veya sefdazidime dirençli 44 *P.aeruginosa* suşundan 21'i metallo-beta-laktamaz geni açısından pozitif bulunmuş ve MBL sıklığı % 48 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20). Kore' de 2000-2001 yılları arasında imipeneme dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta- laktamaz sıklığı %11.4 olarak saptanmıştır (Lee et al., 2002). 1997' de yapılan bir başka çalışmada, karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarında fenotipik olarak MBL enzim üretim sıklığı %24, PCR ile MBL enzim üretim sıklığı %9 olarak saptanmışlardır (Toraman vd., 2005).

Çalışmamız sonucunda PCR analizi ile *blaVIM* geni saptanmış 21 *P.aeruginosa* suşunun karbapenemlere direnci son derece yüksektir. Suşların imipeneme direnç oranı %90.5 belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Çalışmamıza benzer olarak, Oh ve ark. yaptıkları çalışmada VIM-2 pozitif olan 28 *P.aeruginosa* suşunun hepsinin imipeneme dirençli olduğunu, sadece tek bir örneğin seftazidime duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Oh et al., 2003).

Bugüne kadar metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarda gözlenen ortak özelliklerden biri de bu izolatlarda seftazidim direncinin oldukça yüksek olmasıdır (Senda et al., 1996). Çalışmamızda da benzer olarak PCR analizi sonucunda VIM pozitif bulunan bulunan 21 *P.aeruginosa* suşunda sefdazidime direnç oranı %43 gibi yüksek bir oran bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Metallo-beta-laktamazların diğer bir ortak özelliği aztreonamı hidrolize edememeleridir. Ancak bugüne kadar metallo-beta-laktamaz pozitif izolatların çoğunlukla aztreonama da dirençli oldukları rapor edilmiştir (Senda et al., 1996; Toleman et al., 2003). Çalışmamızda bu sonuçlara benzer olarak PCR analizi ile gösteren sonuçlar elde edilmiştir. PCR analizi sonucunda VIM pozitif bulunan 21 *P.aeruginosa* suşunda aztreonama direnç oranı %100 bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çalışmamız sonucunda Ankara' daki üç farklı hastanenin farklı servislerinden ve farklı klinik materyallerden izole edilen toplam 90 *P.aeruginosa* suşunun hastanelere ait servislere ve klinik materyallere göre dağılımları belirlenerek, antibiyotik duyarlılık profilleri incelendi. Özellikle imipenem ve/veya seftazidime duyarlı suşlar belirlendi ve antibiyotiklere direnç gelişiminde büyük bir öneme sahip olan MBL enziminin varlığı hem fenotipik hemde genotipik yöntemlerle saptandı.

*P.aeruginosa* suşlarının çalışmamızda kullanılan Aztreonam, Piperasilin, Seftazidim, Sefepim, Meropenem, İmipenem, Siprofloksasin, Amikasin, Tobramisin, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Tetrasiklin antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını belirlenerek, toplam 20 antibiyotip paterni belirlendi. Toplam *P.aeruginosa* suşlarında antibiyotip 9' un en yüksek antibiyotip oranını verirken antibiyotip 1,10 ve11' in en düşük düzeyde olduğu görüldü (Şekil 4.4). Her üç hastanede de *P.aeruginosa* suşlarının tetrasiklin ve trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranının %100 olduğu, aztreonama ise ikinci sırada en yüksek direnç oranı gösterdiği görüldü. Diğer antibiyotikler içinde üç hastaneden toplanan *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranlarının benzer olduğu saptanırken, amikasin ve seftazidimin çalışma kapsamındaki *P. aeruginosa* suşlarına en etkili antibiyotikler olduğu belirlendi (Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7; Şekil 4.8). Elde edilen bu sonuçlara göre 90 *P. aeruginosa* suşunun 46' sında çoklu antibiyotik direnci belirlendi ve çoklu antibiyotik direnç oranı %51 olarak saptandı (Çizelge 4.2). Böylece çalışmamız kapsamındaki tüm suşlara ait antibiyotik paternlerine incelenerek, *P.aeruginosa* suşlarının tedavisinde en etkili antibiyotiklerin aminoglikozitler grubunda bulunan amikasin veya sefalosporinler grubunda yer alan seftazidim olabileceği belirlendi. Böylece *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve florokinolonlarla beraber infeksiyonların tedavisinde aminoglikozidlerin de eklenerek kombine tedavinin yapılabileceği saptandı.

Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik paternlerine göre imipenem ve/veya seftazidime dirençli suşlar belirlendi ve MBL enziminin tanımlanmasında kullanılan fenotipik yöntemlerden biri olan kombine disk testi uygulandı. İmipenem ve/veya seftazidime dirençli 44 *P. aeruginosa* suşundan 24' ünde MBL enzimi tespit edildi (Çizelge 4.4; Şekil 4.17).

Metallo-beta-laktamaz enzimlerinin başta nonfermentatif bakteriler olmak üzere diğer Gram negatif basiller arasında da hızla yayıldığı bilinmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde MBL' lere bağlı olarak ortaya çıkan imipenem direnci %30' lara ulaşmıştır. Bu nedenle birçok beta-laktam antibiyotiğine karşı direnç geliştirmede önemli bir rol oynayan MBL enziminin tanımlanması direnç yayılımının kontrol edilmesi bakımından oldukça önemlidir. Metallo-beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa* suşlarının çoğunda, beta-laktam direnci yanında aminoglikozitlere ve florokinolonlara direnç de göze çarpmaktadır. Bu izolatlarda MBL enziminin yanı sıra sefalosporinaz, aktif ilaç atım pompaları veya dış membran geçirgenliğinin düşük olması gibi ikinci bir direnç mekanizması da bulunabilmektedir. Bu nedenle rutin laboratuvarlar çalışmalarında, kombine disk testi gibi fenotipik yöntemlerden birinin uygulamaya sokulması ve rutin hale getirilmesi dirençli suşların kontrolü açısından fayda sağlayacaktır. Çalışmamızda MBL enziminin tespiti amacıyla kullandığımız fenotipik yöntemlerden biri olan kombine disk testi, çok basit ve pratik olarak uygulanabilecek, etkili bir yöntemdir. Halen metallo-beta-laktamazların tanısında güvenilirliği kabul edilmiş bir testin olmaması da metallo-beta-laktamaz içeren pek çok izolatin gözden kaçmasına neden olmaktadır (Fidan vd., 2005; Walsh et al., 2005).

Son zamanlarda metallo-beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinin oldukça sınırlı olması nedeniyle, bu enzimi üreten suşların özellikle hastane ortamında yayılmasının önlenmesi son derece önem taşımaktadır (Lee et al., 2003). Bu nedenle MBL varlığının epidemiyolojik risk oluşturduğu hastanelerde gerek tedavinin yönlendirilmesi gerekse zaman ve maliyet açısından yarar sağlayacağından fenotipik yöntemlerin ve PCR çalışmalarının rutin olarak kullanılması gerekmektedir. Fenotipik test ile pozitif bulunan izolatların PCR analizi, hibridizasyon tekniği ve sekans analizi gibi moleküler testlerle mutlaka doğrulanması gerektiği belirtilmektedir. (Fidan vd., 2005; Walsh et al., 2005). Ancak rutinde uygulanan bu fenotipik yöntemlerin, söz konusu suşların ön tespitinde etkili olacak ve bu suşların kontrol altına alınmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızın son aşamasında ise fenotipik olarak varlığı belirlenen 24 *P. aeruginosa* suşunda PCR metodu ile *blaVIM* genleri araştırıldı. Moleküler

inceleme sonucunda toplam 21 örnekte MBL genin varlığı ortaya kondu (Şekil 4.19). Çalışmamızda MBL enziminin varlığını belirleyen fenotipik ve genotipik testler arasında bir uyum görüldü ve sonuçlar literatür çalışmalarıyla desteklendi. MBL enzimi ürettiği saptanan 21 *P.aeruginosa* suşunun hastanelere göre dağılım oranları incelendiğinde, en yüksek oranın Hastane 2' de görüldüğü belirlendi (Şekil 4.21). MBL enzimi ürettiği saptanan 21 suşa ait antibiyotip paternleri incelendiğinde, Hastane 1' de görülen MBL pozitif *P. aeruginosa* suşların sıklıkla antibiyotip 12 ve antibiyotip 14 paternlerini, Hastane 2' de saptanan MBL pozitif suşların genelinde ise bütün antibiyotiklere direnç gösteren antibiyotip 20 paternini verdiği dikkat çekti. Çalışmadaki tüm *P. aeruginosa* suşlarına göre belirlenmiş olan amikasin veya seftazidim ile tedavi seçeneklerinden farklı olarak, bu suşlara piperasilin veya siprofloksasinin de etkili olabileceği belirlendi. Ayrıca bu suşların izole edildiği servis ve klinik materyallere göre dağılım oranı belirlendiğinde en sık genel yoğun bakım ünitesinden ve idrar örneklerinden izole edildiği belirlendi.

Ankara' daki ve Türkiye' deki MBL enzimi üreten suşların belirlenmesi ve kontrolü ile ilgili olarak daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak hastane infeksiyon etkeni olarak *P. aeruginosa* suşlarında ülke genelinde ve tüm dünyada olduğu gibi bizim çalışmamızda da yüksek oranda antimikrobiyal direnç ve çoğul direnç özellikleri görülmektedir. *P. aeruginosa*, birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olmasının yanında antibiyotiklere karşı geliştirdiği kazanılmış direnç oranları giderek artmakta, böylece tedavisi güçleşen ve hayatı tehdit eden birçok hastalığa neden olmaktadır. Direnç gelişimi özellikle spesifik antibiyotik kullanımı sonrası gelişmekte ve hastadan hastaya dirençli suşların yayılımına neden olmaktadır. Tedavide kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı gelişen dirençlerin bir araya gelmesi ve antibiyotikler arasında çapraz direnç gelişimi, çoklu antibiyotik direnç sorununu ortaya koymaktadır (Aloush et al., 2006). Çoklu antibiyotik dirençli ve hastane enfeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlandığından, yüksek maliyet oluşturmaktadır (Üstün, 2007). Bu bağlamda bu suşların belirlenmesi ve yayılımının önlenmesi gerekir. Ülkemizde de bu hızlı yayılımın belirlenebilmesi için çok merkezli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Karbapenem kullanımının gerekli olduğu ünitelerde hızlı, basit, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek iyi bir fenotipik tarama metodu ile MBL enzimi üreten bakterilerin



erken ve doğru bir Şekilde tespit edilerek, bu bakterilerin kontrolsuz yayılımlarının sınırlanmasına gerekmektedir. Çalışmamızda Ankara' da bulunan 3 farklı hastaneden toplanan *P. aeruginosa* suşları arasında MBL enzimine sahip suşların belirmesi ve bu suşların yüksek antibiyotik direnç oranı vermesi, bu suşlarla mücadelede etkin çözüm yollarının bulunması gerektiğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akalın, H., 2007, *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları ve Tedavisi, Klimik 2007 XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
- Akşit, F., Akgün, Y., Kiraz, N., 1996, Mikrobiyoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, No: 490, 57-62.
- Aktaş, E.A., Yiğit, N., Kayserili, F., Ayyıldız, A., 2009, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Araştırılması, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 23 (2), 57-62.
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igma, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., 2006, Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 50(1), p. 43-48.
- Albay, A., 1994, Nötropenik Hastalardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları ve Beta-Laktamaz Aktiviteleri, Doktora Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Ankara, 62 s.
- Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E.H., Iglewski, B., 1997, Vfr Controls Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, 179(12), p. 3928–3935.
- Antibiyotik Duyarlılıklarının Son On Yıl Açısından Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Sivas, 58 s.
- Anvar, H., Strap, J.L., Chen, K. and Costerton, J.W., 1992, Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 36(6), p. 1208-1214.
- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., Goto, M., 2000, Convenient Test for Screening Metallo-b-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, Journal of Clinical Microbiology, 38(1), p. 40–43.
- Bahar, G., Mazzariol, a., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G.M., Cornaglia, G., 2004, Detection of VIM-5 metallo-b-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey, Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
- Baron, E.J., Tenover FC., 1990, Diagnostic Microbiology. St. Louis: The C. V. Mosby Company, 148-386s.
- Baştürk, S., 2005, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli kinolon grubu

antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 61 s.

- Bergagne, E., 2004, *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. In Colman, J., Powerdyly G.W. (eds)., *Infectious Diseases*, second ed., Toronto, 1733-1748.
- Berka, R.M. and Vasil, M.L., 1982, Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and Preliminary Characterization, *Journal of Bacteriology*, 152(1), p. 239-245.
- Bilgehan, H., 1995, Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. *Klinik Mikrobiyoloji*, Barış Kitabevi, İzmir, 161-178s.
- Bonfiglio, G., Russo, G., Nicoletti, G., 2002, Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(4), 529–44.
- Bozkurt, H., Güdücüoğlu, H., Aygül, K., Baykal, S., Berktaş, M., Klinik Örneklerden Üretilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antimikrobiyallere Karşı Gelişen Direnç Oranları, 20. ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi, KEMER ANTALYA, 22 -26 MAYIS 2005.
- Bukholm, G., Tannæs, T., Bye Kjelsberg, A.B., Smith-Erichsen, N., 2002, An Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Associated With Increased Risk of Patient Death In An Intensive Care Unit, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23 (8), 441-446.
- Bush, K, 1989, Characterization of Beta-Lactamases, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 33(3), p. 259-263.
- Bush, K., 2001, New b-Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy, *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1085–9
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995, A Functional Classification Scheme for b-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 39(6), p. 1211–1233.
- Callahan, L.T., 1976, *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin: Purification by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and the development of a highly specific antitoxin serum, *Infection and Immunity*, 14(1), p. 55-61.
- Campana. S., Taccetti. G., Ravenni. N., 2004, Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center, *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 159-163.
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M., Samore, M.H., 1999, Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks

Associated with Different Antipseudomonal Agents, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 43(6), p. 1379–1382.

- Castanheria, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., Walsh, T.R., 2004, Molecular Characterization of a Beta-Lactamase Gene, *bla*GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo-Beta-Lactamase, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 48(12), p. 4654–4661.
- Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Lulitanond, A., Hawkey, P.M., 2001, SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 839-852.
- Chu, Y-W., Afzal-Shah, M., Houang, E.T.S., Palepou, M-F.I., Lyon, D.J., Woodford, N., Livermore, D.M., 2001, IMP-4, a Novel Metallo-b-Lactamase from Nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 45(3), p. 710–714.
- Cingi, İ., Erol, K., Farmakoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, 121-156.
- Coburn, J., Kane, A.V., Feig, L. and Gill, M., 1991, *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity, The Journal of Biological Chemistry, 266(10), pp. 6438-6446.
- Coin, D., Louis, D., Bernillon, J., Guinand, M., Wallach, J., LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 18, p. 175-184.
- Conejo, M.C., Garcia, I., Martínez-Martínez, L., Picabea, L., Pascual, A., 2003, Zinc Eluted from Siliconized Latex Urinary Catheters Decreases OprD Expression, Causing Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 47(7), p. 2313–2315.
- Coşar, M., Tuncer, İ., Arslan, U., 2009, Kan Kültürlerinde Üreyen *Pseudomonas aeruginosa* Auşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 23 (2), 47-50.
- Craig, W.A., 1997, The Pharmacology of Meropenem, a New Carbapenem Antibiotic, Clinical Infectious Diseases, 24(2), pp. 266-275.
- Çeliksöz, C., Karslıgil, T., Balcı, İ., 2009, Seftazidim Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı, Gaziantep Tıp Dergisi, 15(1), 20-23.
- Çıragil, P., Söyletir, G., Şener, B., Erturan Z., 2000, Kistik Fibroz ve Diğer Alt Solunum Yolu Enfeksiyonlarından İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa*

- Kökenlerinin Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg., 32, 197-202.
- Çiftçi, Z., 2005, Kronik tonsillitte biofilmin rolü, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, İstanbul, 69 s.
- Çolak, D., 1999, Genel Bakteriyoloji: Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları, 'İçinde' Ustaçelebi, Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi, 81-89
- Davis D.B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H.S., Wood W.B., 1968. Microbiology. Hober Medical Division, pp. 756-774.
- Denning, G.M., Iyer, S.S., Reszka, K.J., O'Malley, Y.Q., Rasmussen, G.T., Britigan, B.E., 2003, Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 285, 584-592.
- Denning, G.M., Railsback, M.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D., Britigan, B.E., 1998, *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 18, 893-900
- Docquier, J-D., Lamotte-Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J-M., Rossolini, G.M., 2002, On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 10.1093.
- Dong, YH., Zhang, LH., 2005, Quorum sensing and quorum-quenching enzymes, The Journal of Microbiology, 43, p.101-109.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, Clinical Microbiology Reviews, 15(2), p. 167-193.
- Dökmeci, İ., 2000, Farmakoloji Temek Kavramlar, Nobel Tıp Kitapevleri, 857-958.
- Durmaz Çetin, B., Özcan, N., Oktar, M., Hasman, H., Gül, M., 2004, Yara ve Abse Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıklarındaki Üç Yıllık Değişim, Türk Mikrobiyol Cem Derg., 34, 244-247
- Eldere, 2002, Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections, Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
- Ekşi, F., Bayram, A., Balcı, İ., Özer, G., 2007, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması, 37 (3), 142-146.

- Ersöz, G., Otağ, F., Bayındır, İ., Kandemir, Ö., Aslan, G., Kaya, A., 2004, Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Direnci ve Karbapenemlere Dirençli Suşlar İçin Meropenemin MİK Değerleri, ANKEM Derg., 18(1), 28-31.
- Evans, K., Adewoye, L., Poole, K., 2001, MexR Repressor of the *mexAB-oprM* Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR Binding Sites in the *mexA-mexR* Intergenic Region, Journal of bacteriology, 183(3), p. 807–812.
- Eyigör, M., Telli, M., Tiryaki, Y., Okulu, Y., Aydın, N., 2009, Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, ANKEM Derg., 23(3), 101-105.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A., 1998, Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, Infection and Immunity, 66(1), pp. 43-52.
- Fidan, I., Çetin Gürel, F., Yüksel, S., Sultan, N., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Metallo-Beta-laktamaz Sıklığı, ANKEM Derg., 19(2), 68-70.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., 2002, Gram-Negative Bacilli and Coccobacilli, In: Diagnostic Microbiology. 11th edition, Mosby, Missouri, 384-398 p.
- Freitas, A.L., Barth, A.L., 2004, Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype, Molecular and phenotypic typing of *P. aeruginosa* Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37, 77-82.
- Fridkin, S.K., Gaynes, P.R., 1999, Antimicrobial Resistance In Intensive Care Units, Clinics In Chest Medicine, 20(2), 303-316.
- Galloway, D.R., 1991, *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments, Mol Microbiol, 5, p. 2315-21.
- Gayyurhan, E., Zer, Y., Mehli, M., Akgün, S., 2008, Yoğun Bakım Ünitesi Hastalarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Belirlenmesi, Enfeksiyon Dergisi (*Turkish Journal of Infection*), 22 (1), 49-52.
- Giakkoupi, P., Petrikos, G., Tzouvelekis, L.S., Tsonas, S., The WHONET GREECE Study Group, Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C., 2003, Spread of Integron-Associated VIM-Type Metallo-Beta-Lactamase Genes among Imipenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Greek Hospitals, Journal of Clinical Microbiology, 41(2), p. 822–825.

- Gibb, A.P., Tribuddharat, C., Moore, R.A., Louie, T.J., Krulicki, W., Livermore, D.M., Palepou, M-F.I., Woodford, N., 2002, Nosocomial Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a New *bla*IMP Allele, *bla*IMP-7, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 46(1), p. 255–258
- Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S., Hazlett, L.D., 1994, Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1, Infection and Immunity, 62(10), 4572-4579 p.
- Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E., 2004, Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E-Test ve Disk Diffüzyon Yöntemleri İle Araştırılması, Türk Mikrobiyol Cem Derg., 34, 33-36.
- Gülay, Z., 2005, Gram-Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası, ANKEM Derg., 19(Ek 2), 66-77.
- Gülay, Z., 2008, Gram Negatif Bakterilerde Beta Laktam Direnci, Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu, İzmir, 5-11.
- Güler, Ö., Aktaş, O., Uslu, H., 2008, Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilerde Beta-Laktamaz Varlığının ve Çeşitli Antibiyotik Gruplarına Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması, ANKEM Derg., 22(2), 72-80.
- Gültekin, B., Eyigör, M., Aydın, N., 2004, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* Kökenlerinin Antibiyotik Direnci, ANKEM Derg., 18(1), 1-4.
- Günseren, F., Mamıkoğlu, L., Öztürk, S., Yücesoy, M., Biberoğlu, K., Yuluğ, N., Doğanay, M., Sümerkan, B., Kocagöz, S., Ünal, S., Çetin, S., Çalangu, F., Köksal, İ., Leblebicioğlu, H., Günaydın, M., 1999, A surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43, 373–378.
- Hamood, A.N., Griswold, J., Colmer, J., 1996, Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Infection and Immunity, 64(8), p. 3154–3160
- Hancock, R.E.W., 1998, Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria, Clinical Infectious Diseases, 27(1), s. 93–9.
- Heck, L.W., Morihara, K., McRae, W.B. and Miller, E.J., 1986, Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase, Infection and Immunity, 51(1), p. 115-118.
- Hentzer, M., Givskov, M., 2003, Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections, J. Clin. Invest., 112, 1300–1307.

- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M.R., Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function, *Journal of Bacteriology*, 183(18), p. 5395–5401.
- Higgins, P.G., Fluit, A.C., Milatovic, D., Verhoef, C., Schmitz, F.-J., 2003, Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of Antimicrobial Agent*, 21, 409-413.
- Hocquet, D., Bertrand, X., Köhler, T., Talon, D., Plesiat, P., 2003, Genetic and Phenotypic Variations of a Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Clone, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47(6), p. 1887–1894.
- Hoi, D.S.W., Bycroft, B.w., Chhabra, S.R., Williams, P., Pritchard, D.I., 2004, Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules, *Infections and Immunity*, 72(11), p. 6463–6470.
- Iglewski, B.H., Sadoff, J., Bjorn, M.J., Maxwell, E.S., 1978, *P. aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, p. 3211-3215.
- Işık, Y., 2008, *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kinolon direncinin moleküler olarak saptanması, Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri, Ankara, 111 s.
- Iyobe, S., Kusadokoro, H., Ozaki, J., Matsumura, N., Minami, S., Haruta, S., Sawai, T., O'hara, K., 2000, Amino Acid Substitutions in a Variant of IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 44(8), p. 2023–2027.
- Joint, I., Downie, J.A., Williams, P., 2007, Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362, 1115–1117.
- Jones, R.N., Mendes, C., Turner, P.J., Masterton, R., 2005, An overview of the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program: 1997–2004, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53, 247–256
- Kang, P.J., Hauser, A.R., Apodaca, G., Fleiszig, S.M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., Engel, J.N., 1997, Identification of *P. aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. *Mol Microbiol*, 24, p. 1249-1262.
- Kanthakumar, M., Taylor, G., Tsang, K.W.T., Cundel, D.R., Rutman, A., Smith, S., Jeffery, P.K., Cole, P.J., Wilson, R., 1993, Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro, *Infection and Immunity*, 61(7), p. 2848-2853.



- Kaper, J.B., Sperandio, V., 2005, Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract, *Infection and Immunity*, 73(6), p. 3197–3209.
- Karadenizli, A., Kolaylı, F., Gündeş, S., Ergen, K., 2002, *Pseudomonas aeruginosa*'nın Tikarsilin-Klavulanik Aside Duyarlılığının Hastanede Kullanıma Girmeden ve Kullanıma Girdikten Bir Yıl Sonraki Değişiminin Araştırılması, *Klimik Dergisi*, 15(3), s. 89-91.
- Karatuna, O., Yağcı, A., 2008, *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38(1), s. 42-51.
- Kiremitçi, A., Durmaz, G., Akgün, Y., Kiraz, N., Aybey, A., Yelken, B., 2006, Anestezi Yoğun Bakım Ünitesinde Çeşitli Klinik Örneklerden Üretilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnç Profilleri: 2003 Yılı Verileri, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20 (1), 37-40.
- Kireççi, E., Sevinç, İ., 2008, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere İn-Vitro Duyarlılıkları, *ANKEM Derg.*, 22(4), 209-212.
- Koh, T.H., Yeng Wang., G.C., Sng, L-H., 2004, IMP-1 and a Novel Metallo-Beta-Lactamase, VIM-6, in Fluorescent *Pseudomonads* Isolated in Singapore, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48(6), p. 2334–2336.
- Kohanteb, J., Dayaghi, M., Motazedian, M., Ghayumi, M.A., 2007, Comparison of biotyping and antibiotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with burn wound infection and nosocomial pneumonia in Shiraz, Iran, *Pac J Biol Sci*, 10(11):1817-1822.
- Koneman E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn W.C., 1997, The nonfermentative Gram-negative bacilli. Koneman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, sixth edition, Philadelphia, Lippincott, 253-321p.
- Köhler, T., Dumas, JL, Val Delden, C., 2007, Ribosome protection prevents azithromycin-mediated quorum-sensing modulation and stationary-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 51(12), p. 4243–4248.
- Köhler, T., Michea-Hamzeshpour, M., Epp, S.F., Pechere, J-C., 1999, Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 43(2), p. 424–427.
- Köseoğlu-Eser, Ö., Kocagöz, S., Ergin, A., Altun, B., Haşçelik, G., 2005, Yoğun Bakım Ünitelerinde İnfeksiyon Etkeni Olan Gram-Negatif Basillerin Değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 19 (1), 75-80.

- Kurtoğlu, M.G., Bozkurt, H., Yaman, G., Aygül, K., Bayram, Y., Berktaş, M., 2008, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Antimikrobik Direnci, Selçuk Tıp Dergisi, 25, 1-6
- Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., Gombac, F., Bearzi, C., Edalucci, E., Gionechetti, F., Rossolini, G.M., 2004, Endemic Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired Metallo- $\beta$ -lactamase Determinants in European Hospital, Emerging Infectious Diseases, 10(3), 535-538.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002, Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*, PNAS, 99(10), 7072–7077.
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D., Yum J.H., 2001, Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, Clinical Microbiology Infection, 7, 88-91.
- Lee, K., Lim, J.B., Yum, J.H., Yong, D., Chong, Y., Kim, J.M., Livermore, D.M., 2002, *bla*VIM-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(4), p. 1053–1058.
- Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y., 2003, 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(10), p. 4623–4629.
- Libisch, B., Gacs, M., Csiszar, K., Muzslay, M., Rokusz, L., Füzi, M., 2004, Isolation of an Integron-Borne *bla*VIM-4 Type Metallo-Beta-Lactamase Gene from a Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Hungary, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 48(9), p. 3576–3578.
- Livermore, D.M., Interplay of Impermeability and Chromosomal 1B-Lactamase Activity in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 36(9), p. 2046-2048.
- Louis, B., Rice, M.D., Robert, A., Bonomo, M.D., The red menace: Emerging issues in antimicrobial resistance in Gram- negative bacilli. Current Infectious Disease Reports, 1 (4), 338-346.
- Luzzaro, F., Endimiania, A., Docquier, J-D., Mugnaioli, C., Bonsignoria, M., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A., 2004, Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48 , 131–135.

- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E. and Speert, D.P., 1994, Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis, *Infection and Immunity*, 62(2), 596-605 p.
- Mahon, C.R., Manuselis, J.M., 2000, Textbook of diagnostic microbiology, second edition, Saunders, W. B., Philadelphia, 540-554 p.
- Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O'Callagan, R.J. and Wright, J.R., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, 409–418.
- Marina, M., Ivanova, K., Urumov, A., 1999, Comparison of the Activity of Meropenem and Imipenem Against Anaerobic Bacteria in Bulgaria, *Anaerobe*, 5, 439-442.
- McAvoy, M.J., Newton, V., Paull, A., Morgan, J., Gacesa, P., Russell, N.J., 1989, Isolation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* from non-cystic-fibrosis patients and characterisation of the structure of their secreted alginate, *J. Med. Microbiol.*, 28 183-189.
- Mehli, M., Gayyurhan, E.D., Zer, Y., Akgün, S., Özgür Akın, F.E., Balcı, İ., 2007, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' nde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21 (3), 141-145
- Migliavacca R., Docquer, J-D., Mugnaioli, C., Amicosante, G., Daturi, R., Lee, K., Rossolini, G. M., Pagani, L., 2002, Simple Microdilution Test for Detection of Metallo-Beta-Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), p. 4388–4390.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Tenover, M.A., 2002, *Pseudomonas* and Related Organisms. *Medical Microbiology*, Chapter 32, 297-304
- Nicas, T., Bradley, I., Lochner, J. E., Iglewski, B. H., 1985, The role of exoenzyme S in infections with *P. aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 152, p. 716-721.
- Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P.E., Walmsley, H.L., 1988, Inhibition of Tobramycin Diffusion by Binding to Alginate, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 32(4), p. 518-523.
- Nikaido, H., 1998, Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps, *Clinical Infectious Diseases*, 27(1), s. 32–41.
- Nordman, P., Poirel, L., 2002, Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, *Clin Microbiol Infect.*, 8, 321–331.

- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Spitz, D.R., Denning, G.M., Britigan, B.E., 2004, *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, 94–103.
- Oh, E-J., Lee, S., Park, Y-J., Park, J-J., Park, K., Kim, S., Kang, M.W., Kim, B.K., 2003, 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
- Ohl, C.A., Matthew, P., 2004, *Pseudomonas aeruginosa* and Related Bacteria. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. eds. *Infectious Diseases: 3th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1703-1717.
- Öncül, O., 2002, Antibiyotikler I, 2002, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31, s. 23-38.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Türk Dağı, H., Baykan, M., Baysal, B., 2009, Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları, *ANKEM Derg.*, 23(3), 122-126.
- Özgenç, O., Urbalı, A., Erdenizmenli, M., Fidan, N., Arı, A., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 16 (2), 179-182.
- Özkalay, N., Cengiz, A., Ağuş, N., Taneri, N., 2005, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları ve kromozomal  $\beta$ -laktamaz oranları. XII.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Antalya, 22716-20.
- Öztaş, S., Erdem, İ., Saraç, S., Güler, A.Ş., Tümer, Ö., Kurutepe, M., Güney, C., 2007, Balgam Kültüründe *Pseudomonas aeruginosa* Üreyen Hastalarda; Kültür Sonuçları ile Klinik Seyir ve *Pseudomonas* İçin Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi, 13(3), 125-8.
- Pai, H., Kim, J-W., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., Gotoh, N., 2001, Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 45(2), p. 480–484.
- Paterson, 2006, The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species, *Clinical Infectious Diseases*, 43, 43–48.
- Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A-T., Barakett, V., Nordman, P., 1997, OXA-18, a Class D Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum Beta-

- Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 41(10), p. 2188–2195.
- Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., Nordman, P., 2004, Molecular Analysis of Metallo-Beta-Lactamase Gene *bla*SPM-1-Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brazil, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48(4), p. 1406–1409
- Pollack, M., 2002, *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th edition, Elsevier, Philadelphia, 2, 2310-2335.
- Prashanth, K., Singh, S.K., Kanungo, R., Sharma, S., Joshi, S., Jayachandran, S., 2010, Correlation between genotyping and antibiograms of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three different south Indian hospitals, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 28(2), 130-137.
- Pumwe, L., Piddock, L.J., 2000, Two Efflux Systems Expressed Simultaneously in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 44(10), p. 2861–2864.
- Queenan, A.M., Bush, K., 2007, Carbapenemases: the Versatile Beta-Lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), p. 440–458.
- Rasmussen, B.A., Bush, K., Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 41(2), p. 223–232.
- Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., 1999, Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States, *National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit. Care Med.*, 27, 887-892.
- Sandoz, K.M., Mitzimberg, S.M., Schuster, M., 2007, Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, *PNAS*, 104(40), 15876–15881.
- Sarı, H., 2005, Karbapenemlere Dirençli Gram-Negatif Basil İzolatlarında İmipenem-EDTA/ Meropenem-EDTA Disk Yöntemi ve Modifiye Hodge Testi İle Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) Varlığının Araştırılması, *Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Kartal Dr.Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul*, 56 s.
- Schweizer, H.P., 1998, Intrinsic Resistance to Inhibitors of Fatty Acid Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Is Due to Efflux: Application of a Novel Technique for Generation of Unmarked Chromosomal Mutations for the Study of Efflux Systems, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 42(2), p. 394–398.

- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohto, M., 1996, PCR Detection of Metallo-Beta-Lactamase Gene (*bla*IMP) in Gram-Negative Rods Resistant to Broad-Spectrum b-Lactams, *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), p. 2909–2913.
- Sokol, P.A., Iglewski, B.H., Hager, T.A., Sadoff, J.C., Cross, A.S., McManus, A., Farber, B.F. and Iglewski, W.J., 1981, Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infection and Immunity*, 34(1), p. 147-153.
- Srikumar, R., Kon,T., Gotoh, N., Poole, K., 1998, Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a Multidrug-Sensitive *Escherichia coli* Strain, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 42(1), p. 65–71.
- Stapper, A.P., Narasimhan,G., Ohman,D.E., Barakat,J., Hentzer,M., Molin,S., Kharazmi,A., Høiby, N., and Mathee,K., 2004, Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation, *Journal of Medical Microbiology*, 53, 679–690.
- Stephen, H., Hawkey, G., Hawkey, P.M., 2006, Principles and Practice of clinical bacteriology second edition, John Wiley-Sons,ltd,427-435
- Şen A., Halkman A.K., 2006, Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(2),12s.
- Şen Akoğlu, A., 2006, Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerinde çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği ABD, 68 s.
- Şenol, E., 2009, Karbapenemlerin Yeni Açılımları, *ANKEM Derg.*, 23(Ek 2), 14-16.
- Todar, K., 2008, Online Textbook of Bacteriology.
- Toleman, M., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R. N., Walsh, T.R., 2003, Genetic characterization of a novel metallo-b-lactamase gene, *bla*IMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 583–590.
- Toleman, M.A., Rolston,K., Jones, R. N., Walsh, T,R., 2004, *bla*VIM-7, an Evolutionarily Distinct Metallo-Beta-Lactamase Gene in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from the United States, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48(1), p. 329–332.

- Toraman, Z.A., Yakupoğulları, Y., Kizirgil, A., 2004, Detection of metallo beta-lactamase production and antibiotic resistance with E-test method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains, in Turkey, J Infect Chemother., 10, 257–261.
- Towner, K.J., Gee, T., Boswell, T., 2002, An unwanted import to the UK: a carbapenem-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo-beta-lactamase, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50, 1092–1093.
- Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M-F.I., Babini, G.S., Douboyas, J., Livermore, D.M., 2000, Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece, Journal of Clinical Microbiology, 38(3), p. 1290–1292.
- Tunçoğlu, E., Yenişehirli, G., Bulut, Y., 2009, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci, ANKEM Derg., 23(2), 54-58.
- Turan, T., 2007, Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Gönderilen Örneklerdeki *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının İn Vitro
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 2005, Asya Mikrobiyoloji, İzmir, Asya Tıp Kitabevi, 1-59.
- Tysall, L., Stockdale, M.W., Chadwick, P.R., Palepou, M-F.I., Towner, K.J., Livermore, D.M., Woodford, N., 2002, IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49, 215-224.
- Ulusoy, S., 2007, Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında N-açıl homoserin lakton üretiminin araştırılması, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD, İstanbul, 100 s.
- Usluer, G., 2007, Tetrasiklinler ve Kloramfenikol, ANKEM Derg., 21(Ek 2), 45-51
- Üstün, C., 2007, Hastane Kaynaklı Çoklu Antibiyotiğe Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Diyarbakır, 57 s.
- Üstün, C., 2010, Hastane Kökenli Karbapenem Dirençli ve Duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları, ANKEM Derg., 24(1), 1-6.

- Vahaboğlu H., Akhan S.Ç., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. (ed)., İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevi, pp. 1608-1616.
- Vahaboğlu. H., 2001, Yoğun bakım ünitesinde Gram negatif bakteriler ve direnç sorunu. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Adana, s 95.
- Van Delden, C. and Iglewski, B.H., 1998, Cell-to-Cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), p. 551-560.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordman, P., 2005, Metallo-beta-Lactamases: the Quiet before the Storm?, *Clinical Microbiology Rewievs*, 18(2), p. 306–325.
- Weldhagen, G.F., Poirel, L., Nordmann, P., 2003, Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact, *agents and Chemotherapy*, 47(8), p. 2385–2392.
- White, R., Friedrich, L., Burgess, D., Warkentin, D., Bosso, J., 1996, Comparative In Vitro Pharmacodynamics of Imipenem and Meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 40(4), p. 904–908.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Cámara, M., 2007, Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362, 1119–1134.
- Wilmoth, D., Walters, P.E., Tomlin, R., 2001, Caring for adults for cystic fibrosis. *Crit. Care Nurse*, 21, 34-44.
- Wilson W., Sande M., 2004, Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 567-578s.
- Woods, D.E., Iglewski, B.H., 1983, Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: New Perspectives, *Rewievs of Infectious Diseases*, 5(4), pp. 715-722.
- Woods, D.E., Schaffer, M.S., Rabin, H.R., Campbell, G.D. and Sokol, P.A., 1986, Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites, *Journal of Clinical Microbiology*, 24(2), p. 260-264.
- Yamazhan, T., 2007, Sulfonamidler ve Aminoglikozidler, *ANKEM Derg.*, 21(Ek 2), 52-56.



- Yan, J-J., Ko, W-C., Tsai, S-H., Wu, H-M., Wu, J-J., 2001, Outbreak of Infection with Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carrying *bla*IMP-8 in a University Medical Center in Taiwan, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), p. 4433–4439.
- Yan, J-J., Wu, J-J., Tsai, S-H., Chuang, C-L., 2004, 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.
- Yang, Y., Bhached, N., Bush, K., 1995, Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: Permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.*, 35, 75-84.
- Yano, H., Kuga, A., Okamoto, R., Kitasato, H., Kobayashi, T., Inoue, M., 2001, Plasmid-Encoded Metallo-b-Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 45(5), p. 1343–1348.
- Yardy, G.W., Cox, R.A., 2001, An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contaminated urodynamic equipment, *Journal of Hospital Infection*, 47, 60–63.
- Yong., D., Lee, K., Yum, J.H., Shin, H.B., Rossolini, G.M., Chong, Y., 2002, Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-Beta-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., *Journal of Microbiology*, 40(10), p. 3798–3801.
- Yorgancıgil, B., 1999, Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları, *Turgut Özal Tıp Merkezi*, 6(2).
- Yüce, A., 2001, Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, *Klimik Dergisi Cilt 14(2)*, 41-46.
- Yücel, M., Yavuz, T., Kaya, D., Behçet, M., Öztürk, C.E., Şahin, İ., 2006, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi *ANKEM Derg.*, 20(3), 152-155
- Yücesoy Dede, B., 2006, Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları, *Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul*, 72 s.
- Zarakolu, P., Haşçelik, G., Ünal, S., 2006, Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004). *Mikrobiyol Bul.*, 40(3), 147-154.

[www.blinn.edu](http://www.blinn.edu)

[www.merck.com](http://www.merck.com)

[www.microbiologyatlas.kvl.dk](http://www.microbiologyatlas.kvl.dk)

[www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org)

[www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)

[www.vikipedi.com](http://www.vikipedi.com)

