

54747

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA'DA BETA-LAKTAM
ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİN İMİPENEM VE
SEFOKSİTİN İLE İNDÜKLENMESİ**

Tezi Hazırlayan
Gülay BÖREKÇİ

Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Yöneticisi
Doç.Dr.Bülent SÜMERKAN

KAYSERİ-Mayıs-1996

Erciyes Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

10.. / 6. / 1996

Başkan :

Prof.Dr.Ş.Ahmet FAZLI

Üye :

Doç.Dr.Bülent SÜMERKAN

Üye :

Prof.Dr.Tevfik CENGİZ

Üye :

Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL

Üye :

Prof.Dr.İzzet ŞAHİN

Üye :

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Pakize DOĞAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Tarihçe	3
Pseudomonas aeruginosa'nın Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri	4
Dirençlilik	5
Pseudomonas aeruginosa'nın Antijen Yapısı ve Toksinleri	7
Pseudomonas aeruginosa'nın Yaptığı Hastalıklar	7
Korunma	9
Pseudomonas aeruginosa'nın Antimikrobiyal Ajanlara Duyarlılığı ve Beta-laktamaz Üretimi	9
GEREÇ VE YÖNTEM	14
1- Pseudomonas Üreyen Kültürlerin Toplanması	14
2- Pseudomonas aeruginosa'nın İdentifikasyonu	14
3- Beta-laktamaz Testi	15
4- Antibiyotik Duyarlılık Testleri	15
i. Disk Difüzyon Yöntemi	16
ii. Minimal İnhibitör Konsantrasyonun (MIC) Belirlenmesi	16
İstatistiksel Analiz	17
Kullanılan Özel Besiyerleri	18
Kullanılan Ayraçlar	18
BULGULAR	20
1- Beta-laktamaz Test Bulguları	20
2- Disk Difüzyon Bulguları	20
3- Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Bulguları	22
TARTIŞMA	27
SONUÇ	32
ÖZET	33
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	37

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I : Floresan grup Pseudomonas türlerinin ayırımında kullanılan özellikler	6
Tablo II : Beta-laktamazların sınıflandırılması	11
Tablo III : Antibiyotikli ve antibiyotiksiz agardaki disk difüzyon test sonuçları	21
Tablo IV : İlk izolatlar ile subkültürlerin MIC sonuçları	26
Şekil 1 : Beta-laktamaz sentezinin genetik kontrolü	12
Şekil 2 : 20 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki karbenisilin zon çapları	23
Şekil 3 : 36 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki piperasilin zon çapları	23
Şekil 4 : 40 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki aztreonam zon çapları	24
Şekil 5 : 28 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki sefoperazon zon çapları	24
Şekil 6 : 27 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki sefotaksim zon çapları	25
Şekil 7 : 36 Pseudomonas aeruginosa suşunda imipenem ve sefoksitin içeren Mueller-Hinton agar ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agardaki seftazidim zon çapları	25

KISALTMALAR

KCN	: Potasyum siyanür
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
PBP	: Penisilin bağlayan protein
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
CFU	: Colony forming unit
MIC	: Minimal inhibitör konsantrasyon
SD	: Standart sapma
\bar{X}	: Aritmetik ortalama

GİRİŞ

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa*, bu grubun önemli bir patojenidir ve özellikle hastane infeksiyonlarında sürekli artan sayılarda izole edilmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarında, kullanılan antibiyotiğe karşı bakterinin hızla direnç kazanması, tek ilaçla tedavide başarı oranını azaltmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'da yeni kuşak beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin, Tip-I adı verilen beta-laktamazlara bağlı olduğu bildirilmektedir (15,24,27,48,50,55). İmipenem ve sefoksitin Tip-I beta-laktamazların sentezini indüklemektedir (15,37,41,51,63). Bu antibiyotikler, beta-laktamaz oluşumunu artırma kabiliyetinde olduğundan 3. kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinler ile kombine olarak kullanıldığı zaman *in vivo* ve *in vitro* antagonyizm göstermektedirler (10,21,30,45).

Ayrıca, Tip-I beta-laktamaz sentezleyen bakterilerde fazla miktarda enzim sentezleyen ("*dereprese*") mutantlar ortaya çıkmakta ve tedavideki başarısızlıktan daha çok bu mutantlar sorumlu tutulmaktadır (23,36,51).

Bu alışmada, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşu *in vitro* şartlarda sefoksitin ve imipenem ile indüklendi. Bu indükleme sırasında diğer beta-laktam antibiyotiklerin suşlar üzerindeki *in vitro* etkileri araştırıldı.

Ayrıca indükleme sırasında sefoksitin ve imipenem ile karşılaşmış suşlar arasında dereprese mutantların varlığı incelendi.



GENEL BİLGİLER

Pseudomonas aeruginosa toprak, su ve bitkilerden başka normal insanların deri ve dışkısında, hastane çevresinde nemli olan hemen her yerde bulunmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*, vücut direnci düşük kronik infeksiyonlu hastalar için önemli fırsatçı patojenlerden olup hastane infeksiyonlarının % 10-20'sini oluşturmaktadır (8,9,27).

Tarihçe

Önceleri bazı yaralarda ve özellikle cerrahi girişimlerden sonra ameliyat yeri ve gazlı bezlerde yeşil-mavimsi bir irinin oluşumu göze çarpmakta, ancak sebebi bilinmemekteydi. 1860 yılında Fordes, bu pigment üzerinde çalışmış ve 1882'de Gessard ilk defa bir yaradan saf kültür halinde *Pseudomonas aeruginosa*'yı izole etmiş ve iki pigment oluşumunu; kloroformda ve suda eriyebilen pyocianin ve kloroformda erimeyen ancak suda eriyebilen fluorescein'in *Pseudomonas aeruginosa*'nın bir ürünü olduğunu göstermiştir

(2,43). Kısa bir süre sonra da Charrin hayvan patojenitesini gösterdi (14). 1886'da Flügge diğer iki fluoresan *Pseudomonas*, jelatini hidrolize eden *Pseudomonas fluorescens* ve jelatini hidrolize etmeyen *Pseudomonas putida*'yı tanımladı. Daha sonraları *Pseudomonas* genusundaki tanımlar genişletildi ve pek çok tür ilave edildi (43). *Pseudomonas*'lar 1973'te Palleroni ve ark (40) tarafından rRNA/DNA uyumları temel alınarak 5 gruba ayrıldı: rRNA grup I, II, III, IV ve V. *Pseudomonas aeruginosa* rRNA grup I'de tanımlandı (18).

Pseudomonas aeruginosa; *Bacterium aeruginosum*, *Bacterium aerugineum*, *Micrococcus pyocianus*, *Pseudomonas pyocianus*, *Bacillus aeruginosus*, *Bacillus pyocianus*, *Pseudomonas polycolor* gibi isimlerle de anılmıştır (8,18).

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri**

Pseudomonas aeruginosa 0.5 μm eninde ve 1.5-3 μm boyunda, bazen çift çift, bazen de zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır. Çoğu kez bir, nadiren 2-3 adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Bakteriyojik boyalarla kolay boyanırlar ve Gram olumsuzdurlar. Klinik materyallerden izole edilen suşlarda çoğu kez pililer bulunur. Bu pililer hücre yüzeyine tutunmayı artırır ve fagositoza karşı dirençte bir rol oynayabilir (19,27).

Pseudomonas aeruginosa genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla, optimal 30-37 °C'de ve hafif alkali ortamda iyi üremektedir. Bu basiller aeropturlar. Arka arkaya üç pasajdan sonra 41-42 °C'de üreyebilme yeteneği kazanması *Pseudomonas aeruginosa* için önemli bir özelliktir. Bu özellik *Pseudomonas fluorescens*'de yoktur. Buyyonda yüzeyde zar yapmak üzere bol ve homojen bir üreme gösterir ve zarın altında mavi-yeşil pigmenti ayırt edilir (4,8,65).

Pseudomonas aeruginosa 4 tip koloni yapar ve nutrient agardaki koloni görünümüne göre kolaylıkla idantifiye edilir (8,43). Yuvarlak, yumuşak, ortası kabarık, beyaz (Tip 1), koliform kolonilere benzeyen (Tip 2), R kolonileri

(Tip 3) ve kistik fibrozis'li hastaların balgamında bulunan mukoid kolonilerdir (18,43). *Pseudomonas*'ların kültürlerinde tatlımsı, aromatik meyve veya üzüm kokusuna benzer bir koku vardır. % 5 koyun kanlı agarda beta-hemoliz yaparlar. Jelatin ve serum koagüleyi eriterek parçalarlar. Sütü 3-4 günde pıhtılaştırırlar (2,4).

Pseudomonas aeruginosa basilleri suda ve kloroformda eriyen pyocianin; kloroformda erimeyen ancak suda eriyen pyoverdin, pyorubin (kırmızı) ve pyomelanin (kahverengi-siyah) pigmentlerini yaparlar (14,18,19). Pyocianin sadece *Pseudomonas aeruginosa* tarafından meydana getirilir (2,8).

Pseudomonas aeruginosa fermantasyon metabolizmasından ziyade oksidasyon ile karbonhidratlardan enerji açığa çıkarır. Glikozdan gaz oluşturmaksızın asit oluşturur, laktoz ve sakkaroz etkisizdir. Jelatini eritir, üreyi yavaş olarak hidrolize eder. Oksidaz olumlu olması ile bağırsak bakterilerinden ayrılık gösterir. Katalaz, arginin dihidrolaz oluşturur, lizin ve ornitin dekarboksilaz oluşturmaz. Metil kırmızısı ve Voges Proskauer olumsuzdur. Nitratları nitritlere çevirirler. KCN'ye dirençlidirler (4,65) (Tablo I).

Dirençlilik

Pseudomonas'lar ısıya dirençsizdirler. 55 °C'de 1 saat ve 60 °C'de 15 dakikada ölürlere. Kuruluğa dayanıklıdırlar. Çevre ısısı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Dezenfektanlar ve antibiyotiklerin çoğuna direnç gösterirler (4,27,65).

Pseudomonas aeruginosa dörtlü amonyum bileşiklerine (özellikle cetrimide ve benzalkonium chloride) dirençlidirler. Bu amaçla cetrimide agar *Pseudomonas aeruginosa*'nın idantifikasyonunda ayırt edici bir besiyeri olarak kullanılır. Bu genusun diğer üyeleri (*Pseudomonas fluorescens* hariç) ve non-fermantatifler inhibe olurlar (4,43).

Tablo I. Floresan grup *Pseudomonas* türlerinin ayırımında kullanılan özellikler (18)

Test, Substrat, Morfoloji	P. aeruginosa (84 suş)		P. fluorescens (194 suş)		P. putida (273 suş)	
	+/-	% Pozitif	+/-	% Pozitif	+/-	% Pozitif
Asit:						
Glikoz, % 1 (OFBM)	+	98	+	100	+	100
Fruktoz	+ veya -	89	+	99	+	99
Galaktoz	+ veya -	80	+	97	+	99
Mannoz	+ veya -	77	+	99	+	99
Ramnoz	- veya +	20	- veya +	48	- veya +	32
Ksiloz	+ veya -	85	+ veya -	97	+ veya -	98
Laktoz	-	0	- veya +	12	- veya +	14
Sükroz	-	0	- veya +	47	-	8
Maltoz	- veya +	11	- veya +	36	- veya +	21
Mannitol	+ veya -	68	+	93	- veya +	18
Laktoz, % 10 (PAB)	- veya +	14	+ veya -	62	- veya +	42
ONPG	-	4	-	1	-	1
Pyoverdin	+ veya -	71	+	95	+ veya -	84
Hidrojen sülfid (KIA)	-	0	-	0	-	0
Nitrat redüksiyonu	+ veya -	75	- veya +	19	-	0
Nitrattan gaz oluşumu	+ veya -	61	-	5	-	0
İndofenol oksidaz	+	100	+	100	+	100
Arginin dihidrolaz (DBM)	+	99	+	99	+	99
Lizin dekarboksilaz	-	0	-	0	-	0
Ornitin dekarboksilaz	-	0	-	0	-	0
Fenilalanin deaminoz	-	7	-	3	-	0
Hidroliz:						
Üre	+ veya -	67	- veya +	41	- veya +	43
Eskülin	-	0	-	0	-	0
Tween 80	+ veya -	71	+ veya -	63	-	0
Nişasta	-	7	- veya +	19	- veya +	18
DNA	- veya +	10	-	0	-	0
Lesitin	-	8	+	90	-	0
Jelatin	+ veya -	50	+	100	-	0
Asetamid	- veya +	37	-	1	-	4
Hemoliz	- veya +	39	- veya +	14	-	0
Üreme:						
SS	+ veya -	88	+	97	+	98
Mac Conkey	+	99	+	100	+	100
% 6.5 NaCl	-	7	-	2	- veya +	10
Cetrimide (PA)	+	91	+	96	+	92
MBM+asetat	+	96	+	100	+	100
42 °C üreme	+	100	-	0	-	0
Polimiksin duyarlılığı	+	98	+	97	+	99
Hareket	+	97	+	100	+	100
Flagella sayısı	1		>1		>1	

Tablodaki kısaltmalar: OFBM, OF basal medium; PAB, purple agar base; DBM, decarboxylase base, Moeller; SS, Salmonella-Shigella agar; PA, Pseudosel agar; MBM, Mineral base medium. İşaretler: +, 2 gün içinde % 90 veya daha fazla pozitif; -, % 90 veya daha fazlası reaksiyon vermeyen; + veya -, kültürlerin çoğu pozitif, bazı suşlar negatif; - veya +, suşların çoğu negatif, bazı kültürler pozitif; 1, polar monotrichous flagella; >1, polar multitrichous flagella.

Pseudomonas aeruginosa'nın Antijen Yapısı ve Toksinleri

Pseudomonas aeruginosa lipopolisakkarit yapısında O antijeni, H antijeni ve pilus antijenine sahiptir. On adet O grubu tanımlanmış, H antijenleri ile kombinasyon suretiyle 29 serotip bulunmuştur (2,8).

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının çoğu lipase, esteraz, lesitinaz, elastaz, koagülaz, DNase ve biri fosfolipaz diğeri glikolipid yapısında 2 hemolizin içeren ekstrasellüler enzimler oluştururlar (4,18,43).

Pseudomonas aeruginosa'nın birçok suşu doku nekrozuna sebep olan ve hayvanlar için öldürücü etkisi olan ekzotoksin A meydana getirir. Bu toksin, difteri toksinine benzer bir mekanizma ile protein sentezini inhibe eder (14, 27).

Bazı sürgünlere de yol açtığı bilinen Pseudomonas aeruginosa'nın bir enterotoksini bulunmuştur (2,8).

Pseudomonas aeruginosa suşlarının çoğu insan ve sığır lökositlerine karşı aktif bir lökosidin ile glikoprotein yapısında bir sümük (slime) tabakası meydana getirirler (14,27).

Pseudomonas aeruginosa'nın Yaptığı Hastalıklar

İnsan ve memeli hayvanların bağırsağında bulunabilen Pseudomonas aeruginosa fırsatçı patojen bir bakteri olarak; deri, deri altı dokuları, kemik ve eklemler, göz, kulak, mastoid hücreleri, paranazal sinüsler, meninksler ve kalp kapakları gibi çeşitli yerlerde infeksiyona neden olabilir. Ayrıca belirgin bir primer odak olmaksızın bakteriyemi de ortaya çıkabilir (2,16,44).

Pseudomonas aeruginosa cerrahi yaralardan, varis ve dekübitüs ülserlerinden ve yanıklardan özellikle antibiyotik tedavisinden sonra sık olarak izole edilir. Ayrıca Pseudomonas aeruginosa tüberküloz ve osteomyelitte bağlı olarak oluşan sinüsleri de sekonder olarak infekte edebilir (19,22).

Pseudomonas aeruginosa'ya bağlı osteomyelit nadirdir; pn6moni, bakteriyemi, intraven6z ilaç bağımlılığı veya delici bir yaranın komplikasyonu olarak oluşur (14,16).

Pseudomonas aeruginosa infeksiyonunun kulakla ilgili en sık formu otitis externa'dır. Otitis media ve mastoidit ise çoğunlukla Gram pozitif bakterilerin antibiyotiklerle tedavisinin ardından bir s6perinfeksiyon Őeklinde ortaya çıkar (19,22,44).

Pseudomonas aeruginosa'nın etken olduğu g6z infeksiyonlarının en ağır formu kornea 6lserasyonudur, çoğunlukla travmatik bir sıyrıktan sonra gelişir ve g6z6n harabiyetine yol açar (8,16).

Pseudomonas aeruginosa idrar yollarında sık rastlanan bir patojendir ve çoğunlukla yinelenen 6retral manip6lasyonlar uygulanmış veya 6rolojik bir ameliyat geirmış obstr6ktif 6ropatili hastalarda bulunur (22). Genital infeksiyon paraplejik hastalarda, kronik 6riner sistem infeksiyonunun bir komplikasyonudur (14).

Primer *Pseudomonas* pn6monisi nadirdir. Bronşektazili, kronik bronşitli veya kemoterapiyle baskılanmış, kistik fibrozisli hastaların balgamından sık olarak izole edilmektedir (2,16).

Pseudomonas menenjitisi çoğu kez lomber anestezi ya da tanı amacı ile yapılan lomber ponksiyon esnasında kontamine iğne ve eriyiklerle bakterilerin beyin omurilik sıvısı (BOS)'na verilmesinden sonra oluşur. Bazen sepsis esnasında bakterilerin kan yolu ile menenjlere ulaşarak yerleşmeleri de g6r6lebilir (8,22).

Pseudomonas bakteriyemi insidansı t6m Gram negatif bakteriyemi olgularının % 10-20'sini oluşurmaktadır (14). Spesifik antipsodomonal tedaviye rağmen *Pseudomonas aeruginosa* sepsisinde 6l6m oranı yaklaşık % 70-80'dir ve t6m Gram negatif bakteriler içinde en y6kseğini oluşurmaktadır (9,14). Ağır yanıklı hastalarda *Pseudomonas* bakteriyemisi 6l6m nedeni olabilmektedir. Premat6reler, konjenital defektleri olan çocuklar, lenfoma, l6semi veya başka bir habis t6m6r6 olanlar, safra kesesi veya 6riner sistem ameliyatı olan yaşlılar bakteriyemiye eğilim g6steren hastalardır (8,16).

Pseudomonas aeruginosa'nın neden olduğu endokardit, primer olarak kardiyak cerrahi uygulanan hastalarda ve intravenöz ilaç bağımlısı olanlarda oluşur ve mortalite % 70'in üzerindedir (44,65).

Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*, süt çocuklarının epidemik diyaresinde etken olarak sorumlu tutulmaktadır (2,16).

Korunma

Primer nozokomiyal patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarını azaltmak için aseptik tekniklere uyulmalı ve infeksiyon kontrol çalışmaları yapılmalıdır. *Pseudomonas* kolonizasyonunu ve infeksiyonunu önlemek amacıyla sistemik antibiyotik profilaksisi yararsız ve sakıncalı olduğundan uygulanmamalıdır. *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı geliştirilmiş fakat yaygın olarak kullanılmayan polivalan bir aşı ve hiperimmün gamma globulin de vardır (16,22,27).

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Antimikrobial Ajanlara Duyarlılığı ve Beta-laktamaz Üretimi**

Hastane dışı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çoğu aminoglikozitlere (amikasin, gentamisin, tobramisin, netilmisin) ve geniş spektrumlu penisilinlere (azlosilin, karbenisilin, tikarsilin, piperasilin) duyarlıdır (27,31, 64,65).

Pseudomonas aeruginosa suşlarında özellikle beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişmesi bu antibiyotiklerin tek başlarına kullanımı sırasında görüldüğünden ciddi infeksiyonlarda ilaç kombinasyonu önerilmektedir (4,31, 44).

Seftazidim, sefoperazon ve sefsulodin gibi üçüncü kuşak sefalosporinler de antipsödomonal aktiviteye sahiptir (31,64,65).

Bundan başka, monobaktam (aztreonam), karbapenem (imipenem) ve yeni florokinolonlar (özellikle siprofloksasin) *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkilidir (32,64).

Pseudomonas aeruginosa'da son yıllarda yeni kuşak beta-laktam antibiyotiklere karşı tüm dünyada bir direnç gözlenmektedir (46,48,50,53).

Pseudomonas'lar beta-laktamaz sentezi, penisilin bağlayan proteinler (PBP)'de değişiklik, permeabilitenin azaltılması gibi mekanizmalarla beta-laktam antibiyotiklere direnç gösterirler (13,39,43).

Permeabilitenin azalmasıyla beta-laktam antibiyotiklerin PBP'lere ulaşmaması *Pseudomonas aeruginosa*'da doğal direnci oluşturur ve bu mekanizmada dış membran proteini olan F-porinlerin rol oynadığı bildirilmektedir (24,31,39,56).

PBP'lerdeki değişikliğe bağlı direnç gelişimi *Pseudomonas*'larda yaygındır (13,31).

Ancak beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençte en sık gözlenen mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile bu antibiyotiklerin inaktive edilmesidir (31,39,64).

Pseudomonas aeruginosa'da beta-laktamaz sentezi kromozomal, plazmid ve transpozon kontrolünde olabilmektedir (43).

Plazmid kontrolünde en az 30 tip beta-laktamaz mevcuttur. Transpozon kontrolünde beta-laktamazlar yeni tanımlanmışlardır, ancak klinik suşlarda çok azı mevcuttur (39,43).

Pseudomonas aeruginosa suşlarının çoğu kromozom kontrolünde beta-laktamaz sentez ederler (34,36,46,52,58). *Pseudomonas aeruginosa*'da yeni kuşak beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin kromozom kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlara bağlı olduğu bildirilmektedir (45,51,53,54). Tip I adı verilen kromozom kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlar indüklenabilen enzimler olup Bush sınıflamasında Sınıf I'de yer almaktadır (Tablo II).

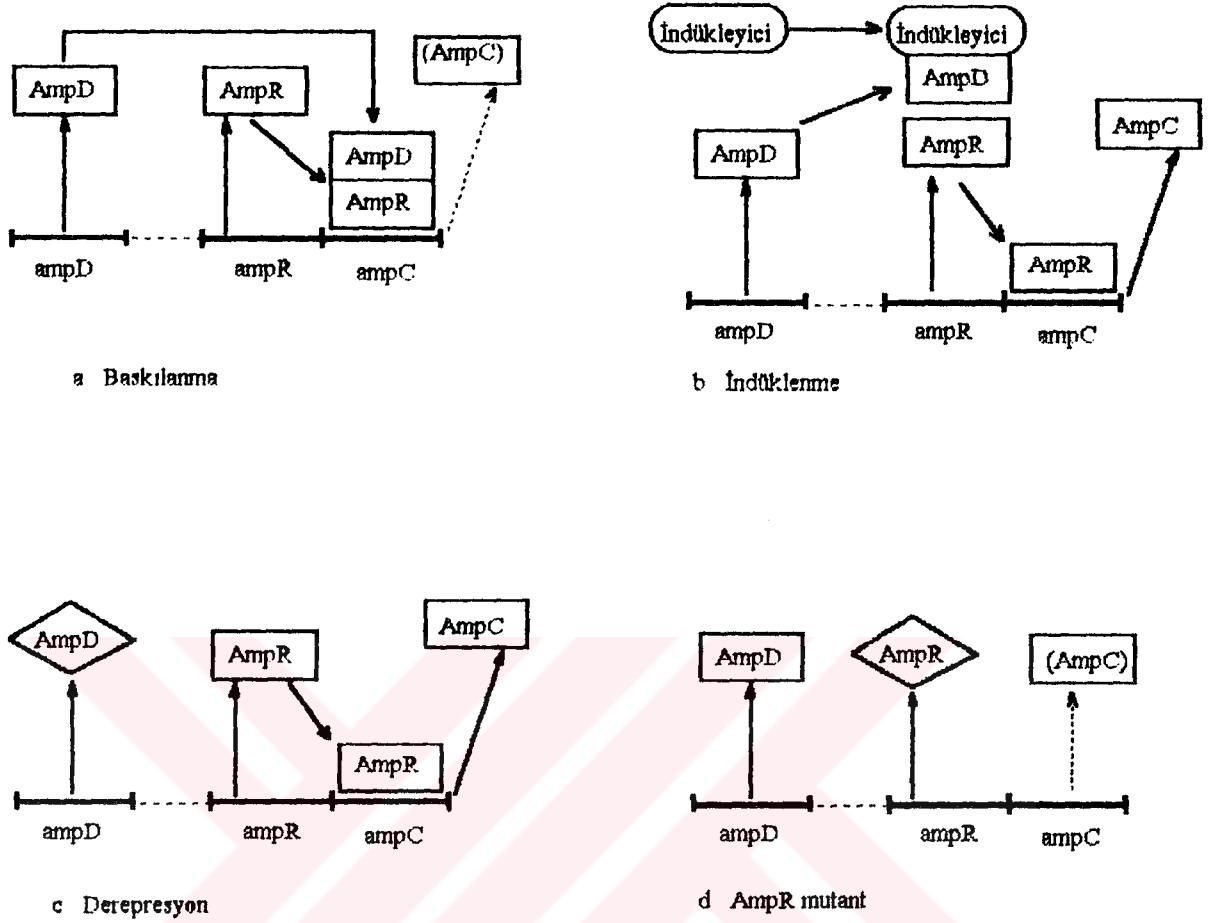
Tablo II. Beta-laktamazların sınıflandırılması (11)

Sınıf	Substrat	Moleküler Sınıf	İnhibe olma		Enzim
			CA ^a	EDTA	
1	Sefalosporinler	C	-	-	Gram negatif bakterilerin ampC enzimleri: MIR-1
2a	Penisilinler	A	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	Penisilinler Sefalosporinler	A	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	Penisilinler Sefalosporinler Monobaktamlar	A	+	-	TEM-3-TEM-26, SHV-2-SHV-6 Klebsiella oxytoca K1
2br	Penisilinler	A	±	-	TEM-30-TEM-36, TRC-1
2c	Penisilinler Karbonisilin	A	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	Penisilinler Kloksasilin	D	±	-	OXA-1-OXA-11 (OXA-10), PSE-2
2e	Sefalosporinler	A	+	-	Proteus vulgaris'in indüklenebilen sefalosporinazları
2f	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	A	+	-	Enterobacter cloacae'nin NMC-A'sı. Serratia marcescens'in sme-1'i
3	Tüm beta-laktamlar	B	-	+	Xanthomonas maltophilia'nın L1'i, Bacteroides fragilis'in cer A'sı
4	Penisilinler	Tanımlanmadı	-	?	Pseudomonas cepacia'nın penisilinazı

^aCA, klavulanik asid

Beta-laktamaz sentezinde en az 3 genin ilgili olduğu bildirilmektedir (5, 34,35). Beta-laktamaz sentezinin genetik kontrolü Şekil 1'de gösterilmektedir.

ampC geni, hemen bütün enterik Gram negatif çomaklarda var olan kromozomal bir genetik lokustan kaynağını alan yapısal bir gendir. Bu bölge ampR olarak adlandırılan bir komşu genetik lokusun varlığında indüklenebilirlik özelliği kazanır. Pseudomonas aeruginosa ampR lokusunu taşıdığı için



Şekil 1. Beta-laktamaz sentezinin genetik kontrolü. (a) Baskılanma, (b) İndüklenme, (c) Derepresyon, (d) Defektif ampR protein sentezi (35)

indüklenebilen sefalosporinaz yapar. ampR genetik lokusu olan bakteriler aktif olarak bu enzimi sentez edebilirler ve üçüncü bir bölgenin ampD lokusunun baskılayıcı kontrolü altındadır. Tip I beta-laktamaz yapan bakteriler ancak ampD bölgesi varlığında indüklenerek ortaya çıkabilirler (35,41).

Penemler (örn: Sch 34343), karbapenem'ler (imipenem) ve α -metoksi sefalosporinler (sefoksitin, sefmetazol) güçlü indükleyicilerdir (15,37,41,63). Aynı zamanda güçlü indükleyiciler hem *in vitro* hem de *in vivo* labil zayıf indükleyicilerin (sefotaksim, tikarsilin) aktivitesini antagonize edebilir (41,42,45).

Enzim normalde bu represör mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken sefoksitin ve imipenem gibi bir beta-laktamaz indükleyicisi varlığında bu represyon kalkmaktadır. Böylece beta-laktamaz enzimi sentezinde büyük bir artış olmakta ve antibiyotiğin hidrolizi artmaktadır. Ancak bunun etkisi kalıcı olmamakta, antibiyotik ile temas kesildiği anda enzim sentezi normale dönmektedir (34,41).

Pseudomonas aeruginosa suşlarında kromozomal ampC geninden köken alan ancak plazmid üzerinde yerleşmiş dirençler bildirilmektedir. Bunların en önemli özellikleri plazmid üzerinde yer aldıklarında indüklenebilen özelliklerini yitirmeleridir (25).

Tip-I beta-laktamaz sentezleyen bakteri toplumlarında 10^{-5} - 10^{-7} sıklıkta "dereprese" mutantlar ortaya çıkmaktadır (36). Bu mutantlar özellikle zayıf indüksiyona yol açan beta-laktam antibiyotiklerin kullanımı ile seleksiyona uğramakta ve tüm bakteri toplumuna hakim olmaktadır (52,54). Dereprese organizmaların yeni beta-laktam antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanıldığı yerlerde seleksiyona uğrayarak hastane ortamında yayılabileceği öne sürülmektedir (36,54). Böylece Tip-I beta-laktamaz sentezleyen bakteriler ile oluşan infeksiyonlarda tedavinin başarısız kalması söz konusudur (50,54).

GEREÇ VE YÖNTEM

1- Pseudomonas Üreyen Kültürlerin Toplanması

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda izole edilerek gliserinli Brucella Broth besiyerinde -70 °C'de saklanan Pseudomonas suşlarından rastgele 40 izolat seçildi ve çalışmaya alındı. Çalışma yapılacağı zaman bu suşların stok kültürlerinden iki kez kanlı agara ekimleri yapıldı.

Pseudomonas üretilen örneklerin 18'i idrar, 7'si yara, 4'ü boğaz, 3'ü kulak, 3'ü pü, 2'si kan, 1'i balgam, 1'i trakeostomi sürüntüsü, 1'i kateter idi.

2- Pseudomonas aeruginosa'nın İdentifikasyonu

Rutin bakteriyolojik testlerde Pseudomonas olarak belirlenen izolatlar, Pseudomonas aeruginosa için selektif bir besiyeri olan Cetrimide agara ekim-

leri yapıldı ve 35 °C'de 24 saat enkübe edildi. Ceftriakson agarda üreyen bakterilerin üç kez arka arkaya pasajı yapılarak 42 °C'de enkübe edildi. 42 °C'ye dayanıklı olanlar *Pseudomonas aeruginosa* olarak idantifiye edildi (18).

3- Beta-laktamaz Testi

Pseudomonas aeruginosa suşlarının beta-laktamaz aktiviteleri asidimetrik yöntem ile araştırıldı (26). Substratın hazırlanması için % 0.5'lik fenol kırmızısı solüsyonundan 2 ml alınarak 16.6 ml steril distile su ile karıştırıldı. Bu karışım 20×10^6 ünite penisilin G içeren şişeye aktarıldı, iyice eritildikten sonra bu karışıma menekşe rengi elde edilinceye kadar 1 M NaOH'ten damla damla karıştırıldı (pH: 8.5). Mikroplak kuyucuklarına 50 µl fenol kırmızısı penisilin substratından konuldu. Üzerlerine de Mc Farland 4'e göre ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 50 µl katıldı. 15 dk içerisinde menekşe renginin sarıya dönüşmesi durumunda test pozitif kabul edildi. Kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

4- Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri *Pseudomonas aeruginosa* olarak idantifiye edilen toplam 40 suшта National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) esas alınarak yapıldı (38). Tüm suşlar üç kez test edilerek ortalama değerleri belirlendi. Yapılan testlerde kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.

i. Disk Difüzyon Yöntemi

Antibiyotik duyarlılığı standart disk agar difüzyon yöntemiyle araştırıldı.

Oxoid üretici firmadan temin edilen karbenisilin (100 µg), piperasilin (100 µg), sefoperazon (75 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg) standart antibiyotik diskler kullanıldı. Aztreonam (Turgut İlaçları) diski (30 µg/disk, Whatman no: 17) laboratuvarında hazırlandı.

Mueller-Hinton besiyerine imipenem (0.02 µg/ml) ve sefoksitin (0.02 µg/ml) eklenerek iki antibiyotikli ve bir antibiyotiksiz olmak üzere üç ayrı besiyeri hazırlandı.

Pseudomonas aeruginosa olarak belirlenen kültürlerden 3-4 koloni alındı ve 5 ml Mueller-Hinton sıvı besiyerine ekildi. Hazırlanan bu saf süspansiyonlar 37 °C'de 18 saat enkübe edildi. Bu kültürlerden 1 ml alınarak 37 °C'ye ısıtılmış 9 ml taze Mueller-Hinton sıvı besiyerine ilave edildi ve 37 °C'de 2 saat enkübe edilerek logaritmik üreme fazı elde edildi. Bu bakteri süspansiyonu yaklaşık 1.5×10^8 CFU/ml'dir.

Hazırlanan bakteri kültüründen bir pamuklu silgiç ile her üç besiyerine yüzeyel yaygın ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra 35 °C'de 16-18 saat enkübe edildi. İnhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü ve imipenem ve sefoksitin içeren besiyerinde kontrole göre inhibisyon zonda daralma indüklenme olarak değerlendirildi.

ii. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonun (MIC) Belirlenmesi

Pseudomonas aeruginosa'nın ilk izolatlarında imipenem, sefoksitin ve seftazidim MIC değerleri Makrodilüsyon metodla araştırıldı.

Bu testte besiyeri olarak Gram negatif çomaklar için önerilen Ca^{++} ve Mg^{++} ile tamponlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanıldı.

İmipenem, sefoksitin ve seftazidim üretici firmalardan potensleri belirtilmiş toz halinde sağlandı ve stok solüsyonları 5120 µg/ml olacak şekilde hazırlanarak -20 °C'de saklandı.

Steril koşullarda Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ ile tamponlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyerinden 1. tüp dışında tüm tüplere 1'er ml dağıtıldı. Antibiyotik konsantrasyonu istenilen konsantrasyonun iki katı olacak şekilde hazırlandı ve 1. ve 2. tüplere 1'er ml dağıtıldı. İkinci tüpten başlayarak son tüpe kadar 1'er ml aktarıldı. Son tüp kontrol olarak çalışıldı. Mueller-Hinton sıvı besiyerinde üretilen ve yaklaşık 5x10⁶ CFU/ml olacak şekilde hazırlanan bakteri kültürlerinden 1 ml tüm tüplere dağıtıldı. 35 °C'de 16-20 saat enkübe edildi. Gözle görünür üremenin olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu MIC olarak değerlendirildi.

Daha sonra sefoksitin ve imipenem ile karşılaşmış subkültürlerde dereprese mutantların varlığı araştırıldı. İmipenem ve sefoksitin'in MIC altı konsantrasyonundan 50 µl alınıp, kanlı agara inoküle edildi. 37 °C'de 24 saat enkübe edildi. Buradan 3 ml Mueller-Hinton sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapıp arda arda üç kez pasaj yapıldı. Sefoksitin ve imipenem ile karşılaşmış kültürlerden seftazidim MIC'i belirlendi. İlk izolatlara göre subkültürlerin seftazidim MIC'inde 4 kat veya daha büyük bir artış dereprese mutantların seleksiyonunun bir göstergesi kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizinde Student's-t testi ve Mann-Whitney U testi uygulandı (57).

KULLANILAN ÖZEL BESİYERLERİ**Cetrimide Agar**

Pepton	20 g
Magnezyum sülfat	1.4 g
Potasyum sülfat	10 g
Agar	13.6 g
Cetrimide	0.3 g
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml
pH: 7.2	

Kimyasal maddeler ısıtılarak eritildi. Yaklaşık 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

KULLANILAN AYIRAÇLAR**% 0.5'lik Fenol Kırmızısı Eriyiği**

Fenol kırmızısı	0.5 g
Sodyum klorür (0.1 N)	20 ml
Saf su	80 ml

Ca⁺⁺ stok solüsyonu

Ca ⁺⁺ 2H ₂ O	3.68 g
Distile su	100 ml

Membran filtresi ile steril edildi. Kullanıncaya kadar +4 °C'de saklandı.
Bu solüsyon 10 mg/ml Ca⁺⁺ içermektedir.

Mg⁺⁺ Stok Solüsyonu

MgCl ₂ 6H ₂ O	8.36 g
Distile su	100 ml

Membran filtresi ile steril edildi ve kullanıncaya kadar +4 °C'de saklandı.
Bu solüsyon 10 mg Mg⁺⁺/ml içermektedir.

Final konsantrasyon (20-25 mg/L Ca⁺⁺ ve 10-12.5 mg Mg⁺⁺/L).



BULGULAR

1- Beta-laktamaz Test Bulguları

Ayırımı yapılan 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 39'unda (% 97.5) Asidimetrik yöntemle beta-laktamaz pozitif bulundu.

2- Disk Difüzyon Bulguları

Antibiyotik duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından bildirilen ve *Pseudomonaslar* için önerilen karbenisilin'in ≥ 37 mm, piperasilin'in ≥ 18 mm, aztreonam'ın ≥ 22 mm, sefoperazon'un ≥ 21 mm, sefotaksim ve seftazidim'in ≥ 23 mm'de duyarlı, karbenisilin'in 14-16 mm, piperasilin'in 15-17 mm, aztreonam'ın 16-21 mm, sefoperazon'un 16-20 mm, sefotaksim'in 15-22 mm, seftazidim'in 15-17 mm'de orta duyarlı, karbenisilin'in ≤ 13 mm, piperasilin'in ≤ 17 mm, aztreonam ve

sefoperazon'un ≤ 15 mm, sefotaksim ve seftazidim'in ≤ 14 mm zon çapı dirençli kabul edildi.

Pseudomonas aeruginosa olarak idantifiye edilen 40 suşun 19 (% 47.5)'u karbenisilin'e, 35 (% 87.5)'i piperasilin'e, 39 (% 97.5)'u aztreonam'a, 27 (% 67.5)'si sefoperazon'a, 26 (% 65)'sı sefotaksim'e ve 35 (% 87.5)'i seftazidim'e duyarlı ve/veya orta duyarlı bulundu. Çalışmaya alınan bu suşların 21 (% 52.5)'i karbenisilin'e, 5 (% 12.5)'i piperasilin'e, 1 (% 2.5)'i aztreonam'a, 13 (% 32.5)'ü sefoperazon'a, 14 (% 35)'ü sefotaksim'e ve 5 (% 12.5)'i seftazidim'e dirençli olduğundan değerlendirilmeye alınmadı.

Antibiyotiklere duyarlı ve orta duyarlı suşların sefoksitin (0.02 $\mu\text{g/ml}$) ve imipenem (0.02 $\mu\text{g/ml}$) içeren ve antibiyotiksiz besiyerlerindeki karbenisilin, piperasilin, aztreonam, sefoperazon, sefotaksim ve seftazidim zon çapları milimetrik olarak ölçüldü ve Tablo III'te gösterildi. Antibiyotiksiz besiyerlerindeki bu antibiyotiklerin zon çaplarına göre, sefoksitin ve imipenemin sub-inhibitör konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki zon çaplarının azalması indüklenmeye bağlı antagonizm olarak değerlendirildi.

Tablo III. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz agardaki disk difüzyon test sonuçları

Antibiyotik	Zon Çapları (mm) \pm SD		
	Antibiyotiksiz Mueller-Hinton Agar	Mueller-Hinton Agar+Sefoksitin	Mueller-Hinton Agar+İmipenem
Karbenisilin n=19	15.50 \pm 0.78	15.57 \pm 1.01	14.67 \pm 0.57
Piperasilin n=35	22.21 \pm 4.48	22.27 \pm 4.90	19.96 \pm 3.39
Aztreonam n=39	21.77 \pm 2.70	21.87 \pm 2.58	21.02 \pm 2.30
Sefoperazon n=27	20.45 \pm 2.80	20.26 \pm 3.15	17.91 \pm 2.46
Sefotaksim n=26	16.15 \pm 1.10	15.74 \pm 1.28	8.89 \pm 3.60
Seftazidim n=35	21.11 \pm 1.86	20.94 \pm 2.06	19.57 \pm 1.64

Toplam 19 suşta karbenisilin zon çapı Mueller-Hinton agar'da ortalama (\bar{X}): 15.50 mm; Mueller-Hinton agar + sefoksitin 15.57 mm Mueller-Hinton agar + imipenem 14.67 mm; 35 suşta piperasilin zon çapı \bar{X} : Mueller-Hinton agar'da 22.21 mm, Mueller-Hinton agar + sefoksitin 22.27 mm, Mueller-Hinton agar + imipenem 19.96 mm; 39 suşta aztreonam zon çapı \bar{X} : Mueller-Hinton agar'da 21.77 mm, Mueller-Hinton agar + sefoksitin 21.87 mm, Mueller-Hinton agar + imipenem 21.02 mm, 27 suşta sefoperazon zon çapı \bar{X} : Mueller-Hinton agar'da 20.45 mm, Mueller-Hinton agar + sefoksitin 20.26 mm, Mueller-Hinton agar + imipenem 17.91 mm, 26 suşta sefotaksim zon çapı \bar{X} : Mueller-Hinton agar'da 16.15 mm, Mueller-Hinton agar + sefoksitin 15.74 mm, Mueller-Hinton agar + imipenem 8.89 mm, 35 suşta seftazidim zon çapı \bar{X} : Mueller-Hinton agar'da 21.11 mm, Mueller-Hinton agar + sefoksitin 20.94 mm, Mueller-Hinton agar + imipenem 19.57 mm olarak bulundu.

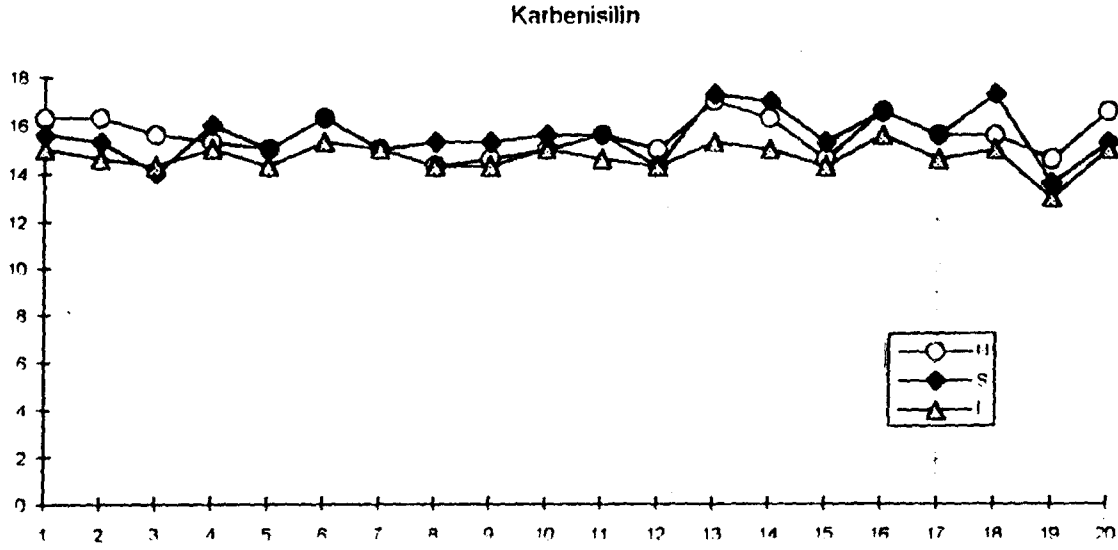
Antibiyotiklerin Mueller-Hinton agarda ölçülen zon çapları ile sefoksitin ve imipenem'in subinhibitör konsantrasyonu ilave edilen agardaki zon çapları kıyaslandı ve Şekil 2, 3, 4, 5, 6, 7'de gösterildi.

Sefoksitin içeren agardaki antibiyotiklerden sadece sefotaksim'in zon çapında azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Diğerleri anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

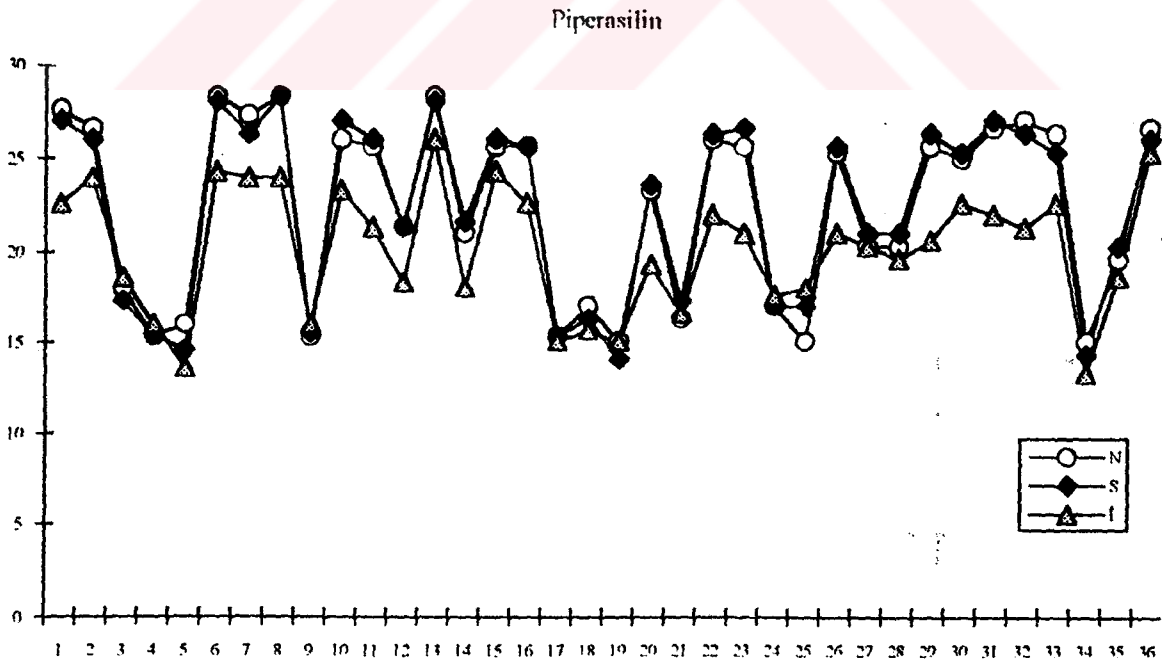
Mueller-Hinton agar ile Mueller-Hinton agar + İmipenem içeren agardaki inhibisyon zon çapları kıyaslandığında aztreonam hariç diğer antibiyotiklerin zon çaplarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

3- Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Bulguları

İlk izolatlarda seftazidim, sefoksitin ve imipenem MIC bulguları ile imipenem ve sefoksitin'in MIC altı konsantrasyondan pasaj yapılarak elde edilen subkültürlerin seftazidim MIC bulguları Tablo IV'te özetlendi. İlk izolatlar ile subkültürler kıyaslandığında suşların hiçbirisinde seftazidim MIC'inde artış bulunmadı.

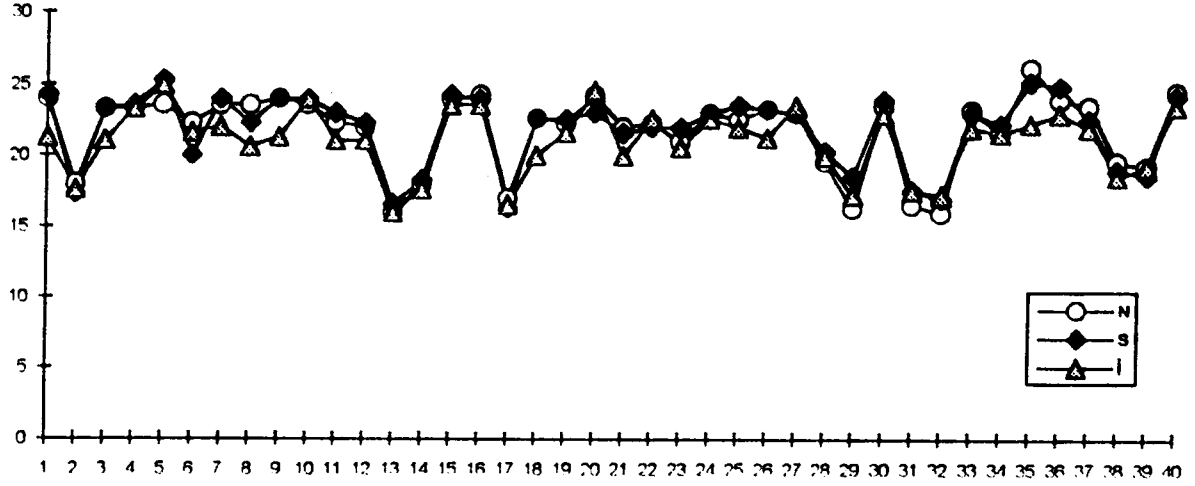


Şekil 2. 20 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p < 0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p > 0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve antibiyotiksiz (o) Mueller - Hinton Agar'daki karbenisilin zon çapları. 20 nolu suş. ATCC 27853



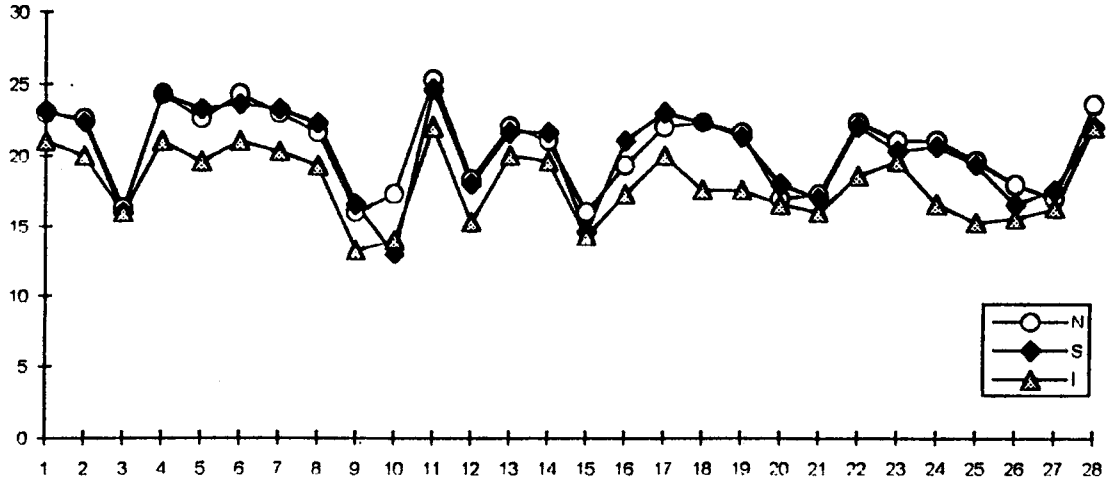
Şekil 3. 36 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p < 0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p > 0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve (o) antibiyotiksiz Mueller - Hinton Agar'daki piperasilin zon çapları. 36 nolu suş. ATCC 27853

Aztreonam



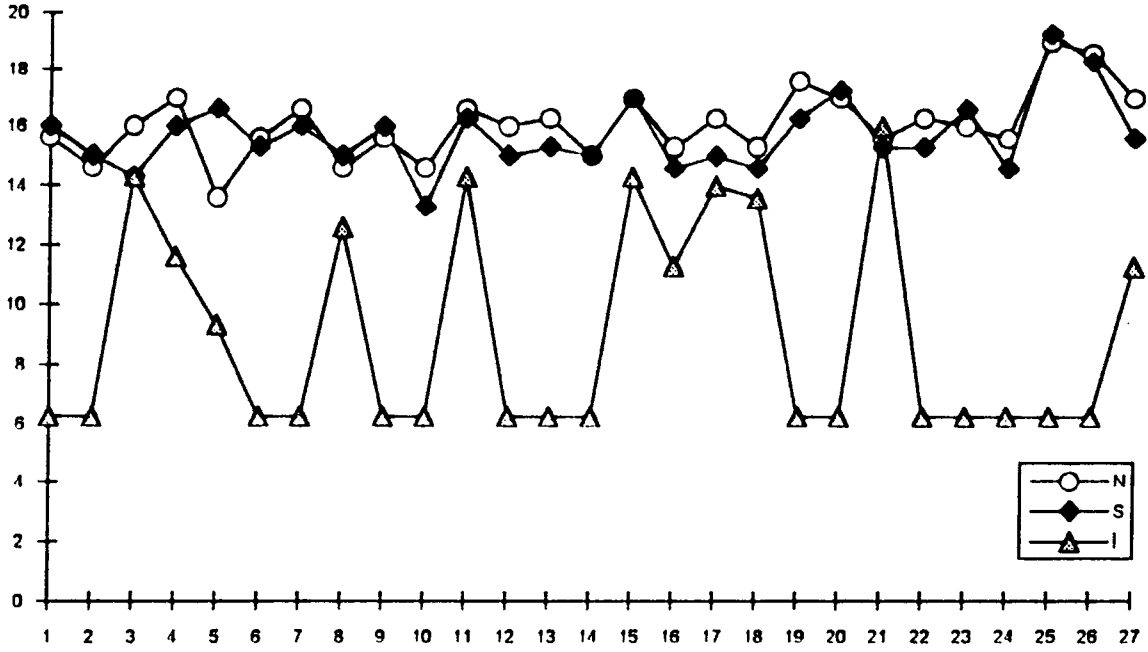
Şekil 4. 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p>0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p>0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve (o) antibiyotiksiz Mueller - Hinton Agar'daki aztreonam zon çapları. ATCC 27853

Sefoperazon



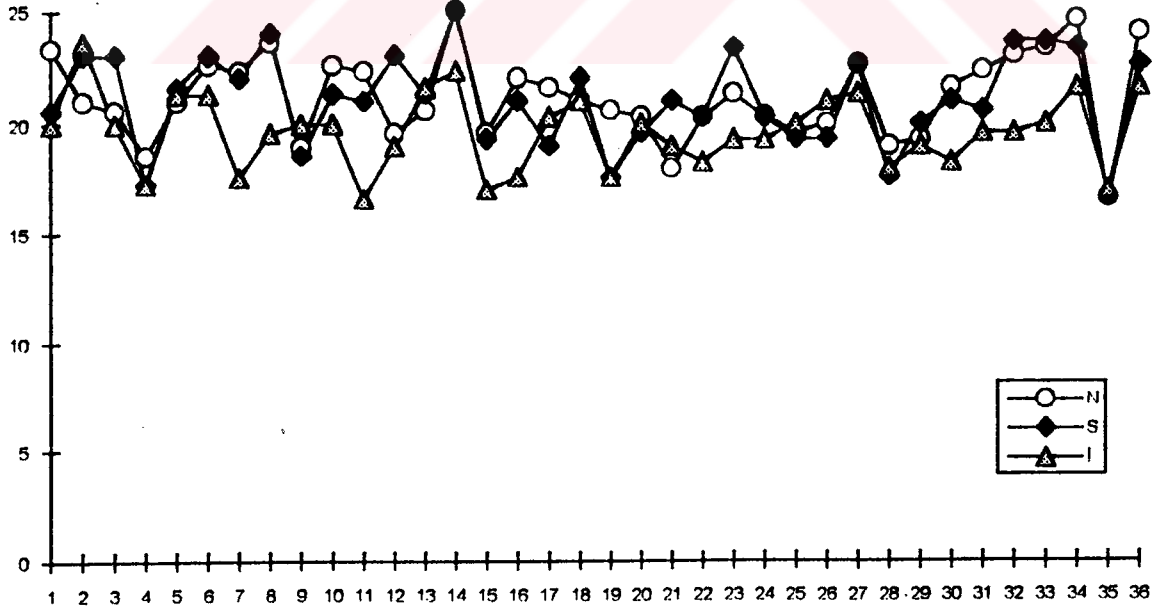
Şekil 5. 28 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p<0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p>0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve (o) antibiyotiksiz Mueller - Hinton Agar'daki sefoperazon zon çapları. ATCC 27853

25
Sefotaksim



Şekil 6. 27 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p < 0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p < 0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve (o) antibiyotiksiz Mueller - Hinton Agar'daki sefotaksim zon çapları. 27 nolu suş. ATCC 27853

Seftazidim



Şekil 7. 36 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (Δ) ($p < 0.05$) ve sefoksitin (\blacklozenge) ($p > 0.05$) içeren Mueller - Hinton Agar ve (o) antibiyotiksiz Mueller - Hinton Agar'daki seftazidim zon çapları. 36 nolu suş. ATCC 27853

Tablo IV. İlk izolatlar ile subkültürlerin MIC sonuçları

Suş No	İlk İzolatların MIC ($\mu\text{g/ml}$)			Subkültürlerin MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	İmipenem	Sefoksitin	Seftazidim	Seftazidim ^a	Seftazidim ^b
ATCC 27853	2	2048	1	1	1
1	1	2048	1	1	1
2	2	2048	2	2	1
3	2	2048	2	2	1
4	8	2048	4	2	4
5	1	2048	8	4	2
6	2	2048	16	8	16
7	1	2048	2	2	1
8	1	2048	2	1	1
9	2	2048	2	2	1
10	2	2048	8	8	4
11	1	2048	2	2	1
12	2	4096	2	2	2
13	2	2048	4	2	4
14	2	2048	32	16	8
15	1	2048	8	2	2
16	1	2048	2	2	2
17	2	2048	2	2	2
18	1	2048	2	1	1
19	2	2048	2	1	2
20	1	2048	8	8	4
21	8	2048	8	8	4
22	4	2048	8	8	4
23	1	2048	0.5	0.5	1
24	16	2048	512	512	512
25	4	2048	8	4	4
26	1	2048	1	1	1
27	1	2048	1	1	2
28	4	2048	8	4	2
29	1	2048	4	4	4
30	1	2048	64	64	32
31	2	1024	2	2	1
32	1	2048	2	2	2
33	2	2048	2	2	2
34	1	2048	1	1	1
35	4	2048	1	1	1
36	1	2048	1	1	2
37	1	2048	2	1	2
38	1	2048	1	1	1
39	2	2048	8	16	16
40	2	2048	1	2	2

a: İmipenem içeren subkültürler

b: Sefoksitin içeren subkültürler

TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa immun yetmezliği olan, uzun süre antibiyotik ve radyoterapi alan, malign veya metabolik hastalığı bulunan, yaşı, kistik fibrozisli, geniş ağır yanıklı kişilerde en önemli infeksiyon etkenlerinden biridir. Bu tip olgularda *Pseudomonas aeruginosa* lokalize yaradan, sistemik endokardit, pnömoni ve menenjitte kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptir (2,18,22,65).

Tedavide beta-laktam antibiyotiklerin bir aminoglikozid ile kombinasyonu önerilmektedir (4,14,31).

Pseudomonas aeruginosa'nın neden olduğu infeksiyonlarda en önemli sorun antibiyotiklere direncin fazla olması ve çabuk gelişmesidir (22,43).

Pseudomonas aeruginosa'da yeni kuşak beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin Tip-I adı verilen kromozom kontrolünde sentezlenen indüklenebilen tipte beta-laktamazlara bağlı olduğu gösterilmiştir (12,45,53,54).

Turhanoğlu ve ark (61) 1991 yılında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 500 Gram negatif bakteri suşunda beta-laktamaz aktivitesini araştırmışlar, *Pseudomonas*'ların % 20'sinde beta-laktamaz olumlu bulmuşlardır.

Jouvenot ve ark (28) 1983 yılında yaptıkları çalışmada karbenisilin'e dirençli 71 *Pseudomonas aeruginosa* izolatının % 70'inde beta-laktamaz pozitif-

liği saptamışlardır.

Kamoun ve ark (29) 366 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında beta-laktamaz pozitifliğini % 79 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ise 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 39'unda (% 97.5) beta-laktamaz pozitif bulundu.

In vivo ve *in vitro* alışmalar bazı beta-laktam antibiyotikler arasındaki antagonizm etkiden beta-laktamaz indüksiyonunun sorumlu olduğunu göstermektedir (6,7,21,33).

Güçlü bir indükleyici ile labil zayıf indükleyici birlikte kullanıldığı zaman antagonist etki oluşarak, labil zayıf indükleyicinin inaktivasyon hızını arttırmaktadır (42,45).

Sefoksitin ve imipenem gibi güçlü indükleyiciler üçüncü kuşak sefalosporinler ve üreidopenisilinlerin aktivitesini antagonize edebilirler (45).

Kasai (30) ratlarda yaptığı çalışmada sefoksitin'in sefotaksim'in antibakteriyel aktivitesini antagonize ettiğini göstermiştir.

Goering ve ark (21) fındık faresinin deneysel infeksiyonlarında sefoksitin'in, sefamandol ve karbenisilin'in etkisini antagonize etme yeteneğini araştırmışlar; *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarında sefoksitin'in karbenisilin'i antagonize ettiğini göstermişler ve tüm *in vivo* testlerle gösterilen antagonistik etkinin reversible beta-laktamaz indüksiyonu ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

Avril ve ark (3) *Pseudomonas aeruginosa*'nın 128 hastane izolatında yaptıkları çalışmada sefoksitin'in seftriakson, piperasilin ve azlosilin'i antagonize ettiğini göstermişlerdir.

Sanders ve ark (49) 41 Gram negatif izolatta sefoksitin'in sefalotin, sefamandol, sefsulodin, sefotaksim, moksalaktam, ampisilin, karbenisilin, piperasilin, mezlosilin ve azlosilin'i antagonize ettiğini ve antagonizm etkinin sıklıkla indüklenebilir sefalosporinaz ihtiva eden suşlarda oluştuğunu bildirmişlerdir.

Then ve Angehrn (60) *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter cloacae*'de indüklenebilen enzim sentezleyen duyarlı suşlarda sefoksitin'in

sefotaksim ve seftriakson'u antagonize ettiğini saptamışlardır.

Miriam ve Lowell (7) 35 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 28'inde imipenem'in düşük konsantrasyonunda piperasilin'in *in vitro* aktivitesini antagonize ettiğini bildirmişlerdir.

Tausk ve ark (59) *Pseudomonas aeruginosa*'nın klinik izolatlarında 9 antipsödomonal beta-laktam antibiyotiğe karşı imipenem'in antagonize etme yeteneği araştırılmış, disk difüzyon testinde *Pseudomonas* izolatlarının % 100'ünde imipenem'e bağlı antagonizm bulunmuştur.

Adalati ve Çevikbaş (1) yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen 34 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem'in sub-minimal inhibisyon konsantrasyonda aminoglikozid ve antipsödomonal beta-laktam antibiyotiklerle antagonizm ve sinerjizm etkisi araştırılmış; aztreonam, sefoperazon, piperasilin ve seftazidim'in imipenem ile antagonistik etki bildirmişlerdir.

Giacometti ve ark (17)'nin çalışmasında 30 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem (0.02 µg/ml) ve meropenem'in (% 0.02 µg/ml) karbenisilin, piperasilin, aztreonam, sefoperazon, sefotaksim, seftazidim ve tikarsilin + klavulanik asite karşı antagonistik etki araştırılmış ve tüm suşlarda antagonizm gösterilmiştir.

Brorson ve Lorsson (10) 46 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında sefoksitin (10 mg/L) ve imipenem (0.01 µg/L) içeren ve antibiyotiksiz olmak üzere üç ayrı besiyerinde sefotaksim, seftazidim, piperasilin ve imipenem'in inhibisyon zon çaplarını ölçerek, sefoksitin ve imipenem içeren besiyerlerinde sefotaksim, seftazidim ve piperasilin zon çaplarının azalmasını anlamlı bulmuşlardır.

Bu çalışmada, sefoksitin (0.02 µg/ml) içeren besiyerinde sadece sefotaksim'in ($p<0.05$) inhibisyon zonunda azalma anlamlı bulunurken, imipenem (0.02 µg/ml) içeren besiyerinde karbenisilin, piperasilin, sefoperazon, sefotaksim ve seftazidim zon çaplarındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulgular diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Bazı Gram negatif bakterilerde indüklenebilir beta-laktamazların artması klinik problemlere neden olmaktadır. Yeni beta-laktam antibiyotiklerle tedavi sırasında çoklu beta-laktam direnci hızla oluşmaktadır. Böyle çoklu direnç gösteren organizmler hastane içinde yayılmakta ve önemli bir nozokomiyal patojen olmaktadır. Özellikle indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* ve *Serratia* türleri gibi mikroorganizmlerle oluşan infeksiyonlara yüksek derecede duyarlı olan yoğun bakım üniteleri, kistik fibrozis merkezleri ve yanık ünitelerindeki hastalar için önemli bir problemdir (20,47,52-54). Bu bakterilerde, beta-laktamaz indüksiyonu ile imipenem hariç, yeni sefalosporinlerin çoğu dahil, sefamisin'ler, monobaktam'lar ve geniş spektrumlu penisilinlere direnç oluşmaktadır (12,24,36,52-54).

Duyarlı suşlardan elde edilen stabil dereprese mutantların seleksiyonunun tedavideki başarısızlığın % 25-75'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (50,54).

Araştırmacılar ilk izolatlar ile karşılaştırıldığında bir veya daha fazla antipsodomonal beta-laktam antibiyotiklerin MIC'inde en az dört kat artışı stabil dereprese mutantların seleksiyonunu gösterdiğini belirtmişlerdir (48,59,60).

Washington ve ark (62) Gram negatif bakterilerde makro ve mikro dilüsyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada dereprese mutantların % 89.7'sinde beta-laktam antibiyotiklere direnç bulmuşlardır.

Sanders ve Sanders (51) 20 *Enterobacteriaceae* ve 5 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında 10 sefalosporin, 4 penisilin, aztreonam, amdinisilin, sch 34343 ve imipenem'in *in vitro* aktivitesini stabil dereprese mutantlarda araştırmışlar, sefalosporinler, penisilinler ve aztreonam'ın Tip-I beta-laktamaz derepresyonu ile *in vitro* aktivitesinin azalmasını anlamlı bulmuşlar ve seftazidim'in sokak tipi suşunda MIC₉₀ 2 (µg/ml) dereprese mutantlarda 128 (µg/ml) olarak bildirmişlerdir.

Curtis ve ark (15) indüklenebilen Tip-I beta-laktamaz sentezleyen Gram negatif bakterilerin sokak tipi ve mutant suşlarında beta-laktam antibiyotikle-

re karşı duyarlılığı karşılaştırmışlar, türlerin tamamında dereprese mutantların indüklenabilir sokak tipi suşlarına göre üçüncü kuşak sefalosporinler de dahil test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılığın azaldığını göstermişler ve *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter Freundii* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da yüksek MIC değerleri elde etmişlerdir.

Tausk ve ark (59)'nın yaptığı çalışmada, imipenem'in subinhibitör konsantrasyonda diğer beta-laktam antibiyotikler üzerindeki etkileri araştırılmış, 74 *Pseudomonas aeruginosa* izolatından 72'sinde (% 97.3) en az bir beta-laktam antibiyotik için dört kat veya daha fazla MIC artışı gösterilmiştir. Bu organizmlerde pek çok beta-laktam antibiyotiğe karşı direncin artması beta-laktamaz sentezinin artışı ile ilgili olduğu bildirilmiştir.

Giacometti ve ark (17) 30 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında stabil dereprese mutantların diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı direncini araştırmışlar, ilk izolatlar ana suşlar ile kıyaslandığında subkültürlerin hiçbirinde seftazidim MIC'inde dört kat veya daha büyük bir artış gösterilememiştir.

Kırk *Pseudomonas aeruginosa* izolatında sefoksitin ve imipenem ile yapılan bu çalışmada; ilk izolatlar ile subkültürler arasındaki seftazidim MIC'i arasında fark yoktu ve Giacometti ve ark'nın yaptıkları çalışma bulgularımızı desteklemektedir.

İndüklenabilir kromozomal beta-laktamaz taşıyan Gram negatif bakteriler klinikte karşılaşılan dirençli infeksiyonların önemli bir kısmında etken olarak ortaya çıkarlar. İmipenem ve sefoksitin gibi güçlü indükleyiciler üçüncü kuşak sefalosporinler ve üreidopenisilinlerin aktivitesini antagonize etmektedir. Dolayısıyla labil bileşiğin inaktivasyon hızının artmasına bağlı olarak tedavide başarısızlık olacağından iki beta-laktam antibiyotiğin kullanımından kaçınılmalıdır. Böyle klinik izolatlar kromozomal beta-laktamazların aşırı miktarda sentezlenmesi sonucu beta-laktamaz inhibitör/beta laktam ilaç kombinasyonları, pek çok sefalosporinler, sefamisin'ler ve monobaktamlara sıklıkla direnç gösterirler. Direnç gelişimini önleyebilmek için hastane ortamında ve hastalarda yeni beta-laktam antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması gerekmektedir.

SONUÇ

- Çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve % 97.5'inde beta-laktamaz pozitif bulunan 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşu; imipenem içeren (0.02 µg/ml) besiyerinde karbenisilin, piperasilin, sefoperazon, sefotaksim ve seftazidimin; sefoksitin içeren (0.02 µg/ml) besiyerinde sadece sefotaksimin inhibisyon zon çaplarında kontrole göre azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). İndüklenmeye bağlı olarak antagonizm etkiden kaçınmak için, iki beta-laktam antibiyotik kullanılmaması gerekmektedir.
- İlk izolatlar ile imipenem ve sefoksitin ile karşılaşmış subkültürler kıyaslandığında suşların hiçbirisinin seftazidim MIC'inde artış bulunmadı ve dereprese mutantların varlığı gösterilemedi. Dereprese mutant gelişimini önleyebilmek için hastane ortamında ve hastalarda beta-laktam antibiyotik kullanılması sınırlandırılmalıdır.

ÖZET

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen 40 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda indüklenmeye bağlı antagonizm disk difüzyon, dereprese mutantların oluşumu Makrodilüsyon yöntemiyle araştırıldı.

İmipenem (0.02 µg/ml) ve sefoksitin (0.02 µg/ml)'li ve antibiyotiksiz Mueller-Hinton agarda suşların karbenisilin, piperasilin, aztreonam, sefope-razon, sefotaksim ve seftazidim diskleri etrafındaki inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü. Kontrole göre imipenem ve sefoksitin subinhibitör konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki zon çaplarının azalması indüklenmeye bağlı antagonizm olarak değerlendirildi. Antibiyotiksiz Mueller-Hinton agar ile Mueller-Hinton agar + imipenem içeren agardaki inhibisyon zon çapları kısaylandığında aztreonam hariç diğer beta-laktamların zon çaplarında azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Sefoksitin içeren agardaki beta-laktamlardan sadece sefotaksim zon çapında azalma anlamlı idi ($p<0.05$).

Pseudomonas aeruginosa'nın ilk izolatlarında ve sefoksitin ve imipenemle karşılaşmış subkültürlerde seftazidim MIC değerleri araştırıldı. Subkültürlerin hiçbirisinde ilk izolatlara kıyasla seftazidim MIC'inde 4 kat veya daha büyük bir artış bulunmadı ve dereprese mutantların oluşumu gösterilemedi.



SUMMARY

Imipenem and cefoxitin induced resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*

Induction-mediated antagonism with disk diffusion method and selection of stably derepressed mutants with Macrodilution methods were investigated on *Pseudomonas aeruginosa*. For this purpose, 40 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Clinical Microbiology Laboratory of Gevher Nesibe Hospital of Erciyes University were selected. Using disk diffusion method, inhibition zones around the carbenicillin, piperacillin, aztreonam, cefoperazon, cefotaxime and ceftazidime disks were measured on two series of Mueller-Hinton agar plates containing imipenem (0.02 µg/ml) and cefoxitin (0.02 µg/ml) and on Mueller-Hinton agar without antibiotic.

A significant reduction of the inhibition zones around the beta-lactam disks on Mueller-Hinton agar with antibiotic compared on Mueller-Hinton agar without antibiotic was evaluated as induction-mediated antagonism.

All beta-lactams tested excluding aztreonam were shown to be subject to imipenem-mediated antagonism in the disk diffusion test. On the other hand only cefotaxime among the beta-lactam tested was shown to be subject to ceftaxime-mediated antagonism.

In vitro selection of stably derepressed mutants resistant to ceftazidime could not be demonstrated in this study.



KAYNAKLAR

1. Adalati R, Çevikbaş A: İmipenemin MİK altı konsantrasyonda aminoglikozid ve antipseudomonas beta-laktam antibiyotikler ile etkileşiminin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. 5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. İstanbul 4-6 Eylül 1995, Kongre Kitabı, s. 52.
2. Akan E: Pseudomonas. Tıbbi Mikrobiyoloji, Oba Kitabevi, Ankara 1986, ss. 192-198.
3. Avril JL, Cayla AM, Guist'hau O, Moillo-Batt A: Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to beta-lactam antibiotics and effects of beta-lactamases. Pathologie Biologie 1983; 31: 471-475.
4. Baron JE, Finegold SM: Nonfermentative Gram negative bacilli and cocobacilli. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. The CV Mosby Company, St. Louis, 1990, pp. 386-407.

5. Bennett PM, Chopra I: Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 153-158.
6. Bergogne-Berezin E: Mechanisms and clinical relevance of antagonism between beta-lactam antibiotics. *Chemioterapia* 1985; 4: 47-52.
7. Bertram MA, Young LS: Imipenem antagonism of the in vitro activity of piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 272-274.
8. Bilgehan H: *Pseudomonas*. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir 1994, ss. 139-156.
9. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja I: Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 279-313.
10. Brorson JE, Larsson P: Sub MIC levels of cefoxitin and imipenem affect disc diffusion zone diameters to cefotaxime, ceftazidime, piperacillin and imipenem for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 287-292.
11. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
12. Colom K, Fdz-Aranquiz A, Suinaga E, Cisterna R: Emergence of resistance to beta-lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa* with group I beta-lactamases in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 964-971.

13. Cooksey RC: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991, pp. 1099-1104.
14. Cross AS: *Pseudomonas aeruginosa*. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). Principles and Practice of Infectious Disease. Churchill Livingstone, New York 1979, pp. 1705-1720.
15. Curtis NAC, Eisenstadt RL, Rudd C, White AJ: Inducible type I beta-lactamases of Gram negative bacteria and resistance to beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1986; 17: 51-61.
16. Eraksoy H: *Pseudomonas mallei* ve *Pseudomonas pseudomallei* infeksiyonları. Büyükoztürk K (ed). İç Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1992, ss. 1005-1008.
17. Giacometti A, Siquini FM, Cirioni O, Petroni S, Scalise G: Imipenem and meropenem induced resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 315-318.
18. Gilardi GL: *Pseudomonas*. In Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991, pp. 350-372.
19. Gilligan PH: *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1995, pp. 509-519.

20. Givercman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hoiby N: Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to *in-vivo* selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 247-259.
21. Goering RV, Sanders CC, Sanders WE Jr: Antagonism of carbenicillin and cefamandole by cefoxitin in treatment of experimental infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 963-967.
22. Gould IM, Wise R: *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical manifestations and management. *Lancet* 1985; 30: 1224-1227.
23. Gwynn MN, Rolinson GN: Selection of variants of Gram negative bacteria with elevated production of type I beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11: 577-581.
24. Hancock REW, Woodruff WA: Roles of porin and beta-lactamase in beta-lactam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 770-775.
25. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N: Plasmid-mediated AmpC type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 984-990.
26. Isenberg HD: Beta-lactamase tests. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. I. American Society for Microbiology, Washington DC, 1992, pp. 5.3.1.-5.3.8.

27. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA: *Pseudomonas, Acinetobacter, Aeromonas, Plesiomonas*. Review of Medical Microbiology, 7th ed. Lange Medical book. California 1989, pp. 215-219.
28. Jouvenot M, Bonin P, Michel-Briand Y: Frequency of beta-lactamases that are markedly active against carbenicillin in the *Pseudomonas* strains isolated in a medical school hospital. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12: 451-458.
29. Kamoun A, Ben Hassen A, Fendri C, Ben Redjeb S: *Pseudomonas aeruginosa* and beta-lactam resistance phenotypes. *Archives de l' Institut Pasteur de Tunis* 1992; 69: 263-271.
30. Kasai K: Antibacterial antagonism of beta-lactam antibiotics in experimental infections. *Chemotherapy* 1986; 32: 148-158.
31. Kayaalp O: Beta-laktam antibiyotikler. *Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1, Feryal Matbaası, Ankara* 1991, ss. 618-693.
32. Kayaalp O: Fluorokinolonlar. *Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1, Feryal Matbaası, Ankara* 1991; ss. 795-805.
33. Kuck NA, Testa RT, Forbes M: In vitro and in vivo antibacterial effects of combinations of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 634-638.
34. Lindberg F, Lindquist S and Normak S: Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I beta-lactamase in nonfastidious Gram negative bacilli. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 782-785.

35. Lindberg F, Normark S: Inactivation of the ampD gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* beta-lactamase. *J Bacteriol* 1987; 169: 1923-1928.
36. Livermore DM: Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in Gram negative rods. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 439-445.
37. Livermore DM, Yang YJ: Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987; 155: 775-782.
38. NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. Publication M7-A2. Villanova Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990.
39. Neu HC: Overview of mechanism of bacterial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12: 109S-116S.
40. Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M: Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int Syst Bacteriol* 1973; 23: 333-339.
41. Phillips I, Shannon K: Class I beta-lactamases induction and derepression. *Drugs* 1989; 37: 402-407.
42. Phillips I, Shannon K: Importance of beta-lactamase induction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12 (Suppl 1): S19-S26.

43. Pitt TL: *Pseudomonas*. In Parker MT, Collier LH (eds). *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 8th ed. Vol 2. Edward Arnold, London 1990, pp. 255-273.
44. Pollock M: *Pseudomonas aeruginosa*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. Vol 2. Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 1980-2003.
45. Rolinson GN: Beta-lactamase induction and resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 1-5.
46. Sanders CC: Novel resistance selected by the new expanded-spectrum cephalosporins: A Concern. *J Infect Dis* 1983; 147: 585-589.
47. Sanders CC: Inducible beta-lactamases and non-hydrolytic resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13: 1-3.
48. Sanders CC: Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 573-593.
49. Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV: In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 968-975.
50. Sanders CC, Sanders WE Jr: Microbial resistance to newer generation beta-lactam antibiotics: Clinical and laboratory implications. *J Infect Dis* 1985; 151: 399-406.
51. Sanders CC, Sanders WE Jr: Type I beta-lactamases of Gram negative bacteria: Interactions with beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1986; 154: 792-800.

52. Sanders CC, Sanders WE Jr: Clinical importance of inducible beta-lactamases in Gram negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 435-438.
53. Sanders CC, Sanders WE Jr: Beta-lactam resistance in Gram negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824-829.
54. Sanders WE Jr, Sanders CC: Inducible beta-lactamases: Clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 830-838.
55. Shannon K, King A, Phillips I: Development of resistance to beta-lactam antibiotics during therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Lancet* 1982; 26: 1466.
56. Stratton CW, Tausk F: Synergistic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19: 413-416.
57. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: *Biyoistatistik*. 3. baskı, Sanem Matbaası, Ankara 1990.
58. Sykes RB, Matthew M: The beta-lactamases of Gram negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2: 115-157.
59. Tausk TF, Evans ME, Patterson LS, Federspiel CF, Stratton CW: Imipenem-induced resistance to antipseudomonal beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 41-45.

60. Then RL, Angehrn P: Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 711-717.
61. Turhanoglu M, Arıkan E, Atmaca S: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan bazı bakterilerde beta-laktamaz enzimi ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 1991; 5: 37-43.
62. Washington II JA, Knapp CC, Sanders CC: Accuracy of microdilution and automicrobic system in detection of beta-lactam resistance in Gram negative bacterial mutants with derepressed beta-lactamase. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 824-829.
63. Wiedemann B, Peter K: Induction of beta-lactamase in Gram negative bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12: 131S-137S.
64. Yao JDC, Moellering RC Jr: Antibacterial agents: In Bolows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991, pp. 1065-1098.
65. Zwadyk P: *Pseudomonas*. In Joklik WK, Willett HD, Amos DB, Wilfert CM (eds). *Zinsser Microbiology*. 20th ed. Appleton and Lange. Connecticut 1992, pp. 576-583.