

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**CEFTAZIDİME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
İZOLATLARINDA PER-1 ve OXA-10 BENZERİ BETA-  
LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

Samsun  
Haziran-2008

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**CEFTAZIDİME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
İZOLATLARINDA PER-1 ve OXA-10 BENZERİ BETA-  
LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

I. Danışman: Doç. Dr. Asuman BİRİNCİ  
II. Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Samsun  
Haziran-2008

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenciliğim süresince eğitimime katkıda bulunan, tez çalışmalarımda değerli bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren danışman hocam, Doç.Dr. Asuman BİRİNCİ'ye,

Tez çalışmamın tüm aşamalarının yürütülmesinde bilgi birikimiyle destek veren ve yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman hocam, Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Tuba YILDIRIM'a,

Doktora eğitimime katkılarından dolayı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Başkanı Prof.Dr. Belma DURUPINAR'a ve bölüm hocalarım Prof.Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Doç.Dr. Murat HÖKELEK'e, Doç.Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, Yrd.Doç.Dr. Çağatay ACUNER'e ve Yrd.Doç.Dr. Özge DARKA'ya teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin bir bölümünde bilgi ve deneyimlerini paylaşan sayın Prof.Dr. Ahmet SANIÇ'e ve Tez İzleme Komitesi Öğretim Üyesi Doç.Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na,

Çalışmamın büyük bir bölümünde değerli bilgi ve önerilerinden yararlandığım Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye,

Tez çalışmalarımda destek ve yardımlarını esirgemeyen Arş.Grv. Kemal Bilgin'e, her türlü teknik konuda bilgi ve deneyimlerini paylaşan Biyolog Ümit OCAKDAN'a, çalışmalarım süresince gösterdikleri dostlukları için asistan arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji AD personeline teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim süresince sonsuz özveri ve hoşgörü gösteren, beni bugünlere getiren sevgili anneme ve babama, her konuda destek olan öteki yarım biricik kardeşime ve gösterdiği sabır, sevgi ve saygı için herşeyim canım eşime sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma T-498 no'lu bilimsel araştırma projesi tarafından desteklenmiştir.

**ÖZET****CEFTAZIDİME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA  
PER-1 ve OXA-10 BENZERİ BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ****Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT, Doktora Tezi****Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Haziran 2008**

*Pseudomonas aeruginosa*'nın özellikle çoklu ilaca dirençli suşları hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Beta-laktamaz üretimi, gram-negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır. Türkiye kaynaklı olan PER-1 ve OXA-10 grubu beta-laktamazlar (OXA-11/14/16) *P. aeruginosa*'da seftazidim direncine neden olurlar.

Bu çalışmada, hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direncine neden olan PER-1 ve OXA-10 grubu beta-laktamaz enzimlerini moleküler yöntemler ile hızlı ve güvenilir olarak tanımlamak, görülme sıklıklarını ortaya koymak ve bu izolatların klonal yakınlıklarını saptayarak yeni oluşacak hastane infeksiyonu olgularını kontrol altına almak hedeflenmektedir.

Seftazidime dirençli 50 adet *P. aeruginosa* izolatında PER-1 ve OXA-10 grubu gen bölgeleri PZR ile tespit edildi. Suşların klonal yakınlıkları RAPD-PZR yöntemiyle belirlendi ve PFGE ile epidemiyolojik analizleri yapıldı. PER ve OXA-10 grubu gen bölgelerinin restriksiyon analizleri yapılarak tipleri belirlendi.

İncelenen suşlarda %46 oranında PER-1 ve %78 oranında OXA-10 enzimi tespit edildi. *P. aeruginosa* izolatları arasında saptanan dört ana klonun yüksek prevalanstan sorumlu olduğu RAPD-PZR sonuçları ile ortaya kondu. PFGE yönteminde de üç ana klonun belirlenmesi izolatların büyük oranda ilişkili olduğunu destekledi. RFLP analizi ile PER-1 ve OXA-11/14/16 enzim genotipleri tanımlandı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında PER-1 ve OXA-10 enzimlerinin yaygın olduğu ve bu enzimi üreten birçok suşun "klonal ilişkili" oluşunun horizontal yayılıma işaret ettiği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelime:** *Pseudomonas aeruginosa*, beta-laktamaz, PER-1, OXA-10, moleküler epidemiyoloji.

**ABSTRACT****DETERMINATION OF PER-1 AND OXA-10-LIKE BETA-LACTAMASES IN CEFTAZIDIME-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES BY MOLECULAR METHODS****Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT, Ph.D. Thesis****University of Ondokuz Mayıs Samsun, June 2008**

*Pseudomonas aeruginosa* strains, especially multidrug resistant, have great of importance among nosocomial infection isolates. Production of beta-lactamase is an important mechanism in gram-negative bacteria for resistance to beta-lactam antibiotics. PER-1 and OXA-10 like beta-lactamases (OXA-11-14-16) were first reported from Turkey, and caused ceftazidime resistance in *P. aeruginosa*.

In this study, our aim was to identify PER-1 and OXA-10 like beta-lactamase enzymes which caused ceftazidime resistance in nosocomial *P. aeruginosa* strains as fast and correctly by molecular methods, to determine the prevalence of these enzymes and to get the nosocomial infections under control by determining their clonal relationship.

PER-1 and OXA-10 presence was sought by PCR in 50 ceftazidime resistant *P. aeruginosa* strains. Clonal relationship of strains was determined by RAPD-PCR and epidemiologic analysis of isolates was investigated by PFGE. Types of PER-1 and OXA-10 like beta-lactamases were analysed by RFLP.

PER-1 and OXA-10 like beta-lactamases were detected in 46 % and 78 % of *P. aeruginosa* strains, respectively. RAPD-PCR results revealed dissemination that the four main clones which were determined among *P. aeruginosa* isolates are responsible for the high prevalence. The determination of three main clones by PFGE also supported that the isolates are nearly related. PER-1 and OXA-10 11-14-16 types were identified by RFLP analyse. We concluded that, the prevalence of PER-1 and OXA-10 enzymes among ceftazidime resistant *P. aeruginosa* isolate was high in our hospital. PER-1 and OXA-10 producers were being transmitted horizontally as most of the isolates are clonally related.

**Key Word:** *Pseudomonas aeruginosa*, beta-lactamases, PER-1, OXA-10, molecular epidemiology.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- AIDS: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu  
AP-PCR: Arbitrarily primed-PCR  
ATCC: American type culture collection  
BOS: Beyin omurilik sıvısı  
Bp: Baz çifti  
CDC: Center for disease control  
CFU: Colony forming unit  
CLSI: Clinical and laboratory standards institute  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
dNTP: Deoksinükleotid trifosfat  
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit  
EF-2: Elongasyon faktör-2  
EMB: Eosine-Methylen Blue  
ERIC: Enterobacterial repetitive intergenic consensus  
GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz  
HIV: Human immunodeficiency virus  
HST: Hücre süspansiyon tamponu  
IBL: İndüklenebilir beta-laktamaz  
İEO: İzoelektrik odaklama  
MDa: Mega dalton  
MDR: Multiple drug resistance  
MHA: Mueller hinton agar  
MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon  
NNIS: National nosocomial infections surveillance system  
OprD: One octapeptide repeat deletion  
PBP: Penisilin bağlayan protein  
PFGE: Pulsed field jel elektroforez  
pH: Hidrojen iyonu  
pI: İzoelektrik noktası

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA

RE: Restriksiyon enzimi

REP-PCR: Repetitive extragenic palindrome

RFLP: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

SDS: Sodyum dodezil sülfat

TBE: Tris-borik asit-EDTA

TE: Tris-EDTA

UPGMA: Unweighted pair group method with mathematical averaging

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

# İÇİNDEKİLER

|  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--|---------------------|
| TEŞEKKÜR                                   | iv                  |
| ÖZET                                       | v                   |
| ABSTRACT                                   | vi                  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                    | vii                 |
| İÇİNDEKİLER                                | ix                  |
| ŞEKİLLER                                   | xiv                 |
| TABLolar                                   | xvi                 |
| <br>                                       |                     |
| 1. GİRİŞ                                   | 1                   |
| 2. GENEL BİLGİLER                          | 3                   |
| 2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | 3                   |
| 2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri    | 3                   |
| 2.1.2. Kültür Özellikleri                  | 4                   |
| 2.1.3. Seçici Besiyerleri                  | 5                   |
| 2.1.4. Pigmentleri                         | 6                   |
| 2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri            | 6                   |
| 2.1.6. İdentifikasyonu                     | 7                   |
| 2.1.7. Epidemiyolojisi                     | 7                   |
| 2.1.8. Patogenezi                          | 9                   |
| 2.1.9. Virulans Faktörleri                 | 10                  |
| 2.1.9.1. Yüzey Adezinleri                  | 10                  |
| 2.1.9.2. Aljinat (Mukoid Ekzopolisakkarit) | 11                  |
| 2.1.9.3. Pigmentleri                       | 11                  |
| 2.1.9.4. Hemolizinler                      | 11                  |
| 2.1.9.5. Ekzotoksin A                      | 12                  |
| 2.1.9.6. Ekzoenzim S                       | 12                  |
| 2.1.9.7. Proteazlar                        | 12                  |
| 2.1.9.8. Endotoksin                        | 13                  |



|  |    |
|--|----|
| 2.1.10. Klinik Önemi ve Oluşturduğu İnfeksiyonlar                                      | 13 |
| 2.1.10.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları  | 14 |
| 2.1.10.2. Septisemi  | 14 |
| 2.1.10.3. Endokardit   | 15 |
| 2.1.10.4. Menenjit   | 15 |
| 2.1.10.5. Yanık ve Yara infeksiyonları   | 15 |
| 2.1.10.6. İdrar Yolu İnfeksiyonları  | 15 |
| 2.1.10.7. Göz İnfeksiyonları   | 15 |
| 2.1.10.8. Kulak İnfeksiyonları   | 16 |
| 2.1.10.9. Kemik ve Eklem İnfeksiyonları  | 16 |
| 2.1.10.10. Gastrointestinal Sistem İnfeksiyonları                                      | 16 |
| 2.1.10.11. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları   | 16 |
| 2.1.11. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnci  | 16 |
| 2.1.12. Antibiyotiklere Direnci  | 17 |
| 2.1.12.1. Doğal Direnç Mekanizmaları   | 17 |
| 2.1.12.2. Kazanılmış Direnç Mekanizmaları  | 18 |
| 2.2. Antipsödomonal Antibiyotikler   | 20 |
| 2.2.1. Sefalosporinler   | 20 |
| 2.2.2. Aztreonam   | 21 |
| 2.2.3. Karbapenemler   | 21 |
| 2.2.4. Kinolonlar  | 21 |
| 2.2.5. Aminoglikozidler  | 22 |
| 2.2.6. Beta-Laktam Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları                              | 22 |
| 2.2.6.1. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Oluşan Değişiklikler                          | 23 |
| 2.2.6.2. Antibiyotiklerin Hücre İçine Girişinin Kısıtlanması ve Aktif Pompa Sistemleri | 23 |
| 2.2.6.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile Antibiyotiklerin İnaktivasyonu                    | 23 |
| 2.3. Beta-Laktamazlar  | 24 |
| 2.3.1. A-Sınıfı Beta-Laktamazlar   | 25 |
| 2.3.2. B Sınıfı Beta-Laktamazlar   | 26 |
| 2.3.3. C Sınıfı Beta-Laktamazlar   | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar   | 26 |
| 2.4. OXA Enzimleri   | 27 |
| 2.5. PER-1 Enzimi  | 27 |
| 2.6. Hastane İnfeksiyonları ve Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji<br>Metodlarının Önemi                   | 29 |
| 2.7. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri  | 30 |
| 2.7.1. Epidemiyolojik Tiplendirmenin Gerekli Olduğu Durumlar   | 32 |
| 2.7.2. Tiplendirmede Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması  | 32 |
| 2.8. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)  | 34 |
| 2.9. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR)  | 35 |
| 2.10. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE)   | 36 |
| 2.10.1. Restriksiyon Profillerinin Analizi ve İzolatların Yakınlık<br>Derecelerine Göre Sınıflandırılması  | 37 |
| 2.10.2. PFGE Profillerinin Yorumlanması  | 38 |
| 3. MATERYAL VE METOD   | 40 |
| 3.1. Materyal  | 40 |
| 3.1.1. Aletler   | 40 |
| 3.1.2. Kimyasal Maddeler   | 40 |
| 3.1.3. Tamponlar   | 42 |
| 3.1.4. Besiyerleri   | 42 |
| 3.2. Metod   | 43 |
| 3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Tiplendirilmesi  | 43 |
| 3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri   | 43 |
| 3.2.3. Çift Disk Sinerji Testiyle GSBL Saptanması  | 44 |
| 3.2.4. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> Grubu Genlerin Polimeraz Zincir<br>Reaksiyon Yöntemiyle Araştırılması | 44 |
| 3.2.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakteri Hücrelerinden DNA<br>Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması       | 44 |
| 3.2.4.2. PZR Optimizasyonu   | 45 |
| 3.2.4.3. PZR Yöntemiyle <i>PER-1</i> Geninin Amplifikasyonu  | 47 |
| 3.2.4.4. PZR Yöntemiyle <i>OXA-10</i> Geninin Amplifikasyonu   | 47 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.4.5. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> Grubu Gen Bölgeleri için Amplifikasyon Programı                           | 48 |
| 3.2.4.6. DNA Elektroforezi   | 48 |
| 3.2.5. Seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi                                      | 48 |
| 3.2.6. İzolatların Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Yöntemiyle Klonal Yakınlıklarının Araştırılması    | 49 |
| 3.2.7. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> Gen Bölgelerinin Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi | 50 |
| 3.2.7.1. <i>PER-1</i> ve <i>PER-2</i> Gen Bölgelerinin RFLP ile Belirlenmesi                                     | 50 |
| 3.2.7.2. <i>OXA-10</i> PZR Gen Bölgelerinin RFLP ile Tiplerinin Belirlenmesi                                     | 51 |
| 3.2.8. İzolatların Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) Yöntemi ile Epidemiyolojik Analizi                       | 52 |
| 3.2.8.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması  | 52 |
| 3.2.8.2. İzolatların Düşük Erime Isılı Agaroza Gömülmesi   | 52 |
| 3.2.8.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Liziz Solüsyonu ile Parçalanması   | 53 |
| 3.2.8.4. Agaroz Kalıpların Yıkanması   | 53 |
| 3.2.8.5. DNA'nın <i>SpeI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi  | 53 |
| 3.2.8.6. DNA Kalıplarının Jele Yüklenmesi ve Elektroforez  | 54 |
| 3.2.8.7. Elektroforez Programı   | 54 |
| 3.2.8.8. Sonuçların Değerlendirilmesi  | 54 |
| 4. BULGULAR  | 55 |
| 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşların İzole Edildikleri Örnek Türleri ve Klinik Servisler                  | 55 |
| 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları  | 56 |
| 4.3. PZR Optimizasyon Sonuçları  | 56 |
| 4.4. PZR Yöntemiyle <i>PER-1</i> Gen Bölgesinin Saptanması   | 59 |
| 4.5. PZR Yöntemiyle <i>OXA-10</i> Gen Bölgesinin Saptanması  | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 4.6. PZR Yöntemi ile <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> Geni Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri | 60 |
| 4.7. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının Klonal Yakınlıkları  | 61 |
| 4.8. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının Restriksiyon Analizleri  | 65 |
| 4.8.1. <i>PER-1</i> Geni PZR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi   | 65 |
| 4.8.2. <i>OXA-10</i> Geni PCR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi  | 66 |
| 4.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının PFGE Yöntemi ile Epidemiyolojik Analizi                       | 69 |
| <br>  |    |
| 5. TARTIŞMA   | 71 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER  | 80 |
| KAYNAKLAR   | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ  | 97 |

## ŞEKİLLER

| <u>Sekil</u>   | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın morfolojik yapısı   | 4            |
| 2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virülans faktörleri   | 10           |
| 2.3. Beta laktamaz enzimlerinin yapısı   | 24           |
| 2.4. A sınıfı beta-laktamazlar ile <i>PER-1</i> enziminin evrimsel yakınlığı                                 | 28           |
| 4.1. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri servisler ve oranları                                 | 55           |
| 4.2. İzolatların elde edildikleri örnek türleri  | 55           |
| 4.3. Çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliği saptanan bir<br><i>P. aeruginosa</i> suşu                 | 56           |
| 4.4. <i>PER-1</i> geni için magnezyum klorür optimizasyonu ile oluşan<br>960 bp'lik bant profilleri          | 57           |
| 4.5. <i>OXA-10</i> geni için magnezyum klorür optimizasyonu sonucu elde<br>edilen 720 bp'lik bant profilleri | 57           |
| 4.6. <i>PER-1</i> gen bölgesi için primer bağlanma ısı optimizasyonu   | 58           |
| 4.7. <i>OXA-10</i> gen bölgesinin belirlenmesi için yapılan primer bağlanma<br>ısı optimizasyonu             | 58           |
| 4.8. <i>P. aeruginosa</i> suşlarında saptanan 960 bp'lik <i>PER-1</i> gen bölgeleri                          | 59           |
| 4.9. 5-28 no'lu suşların 720 bp büyüklüğündeki <i>OXA-10</i> gen bölgeleri                                   | 60           |
| 4.10. 29-49 no'lu suşların 720 bp büyüklüğündeki <i>OXA-10</i> gen bölgeleri                                 | 60           |
| 4.11. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> geni tespit edilen 1-12 no'lu suşların<br>RAPD-PZR sonuçları             | 61           |
| 4.12. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> geni tespit edilen 13-39 no'lu suşların<br>RAPD-PZR sonuçları            | 61           |
| 4.13. <i>PER-1</i> ve <i>OXA-10</i> geni tespit edilen 15-42 ve 43-50 no'lu suşların<br>RAPD-PZR sonuçları   | 62           |
| 4.14. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının RAPD-PZR sonuçları ile oluşturulan<br>grup profilleri               | 62           |
| 4.15. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının RAPD-PCR sonuçlarına göre<br>çizilen dendogramı                        | 63           |

|  |    |
|--|----|
| 4.16. <i>PvuII</i> ile kesim sonrası elde edilen 450, 230, 158 ve 85 bp'lik DNA fragmentlerinin gösterilmesi         | 65 |
| 4.17. <i>StuI</i> enzimi ile kesilmeyen 960 bp'lik <i>PER-1</i> gen bölgeleri  | 66 |
| 4.18. <i>PvuII</i> ile kesim sonrası elde edilen 5-32 no'lu suşların 408 ve 312 bp'lik <i>OXA-10</i> gen bölgeleri   | 67 |
| 4.19. <i>PvuII</i> ile kesim sonrası elde edilen 33-49 no'lu suşların 408 ve 312 bp'lik <i>OXA-10</i> gen bölgeleri  | 67 |
| 4.20. <i>HaeIII</i> ile kesim sonrası elde edilen 5-32 no'lu suşların 196 ve 524 bp'lik <i>OXA-10</i> gen bölgeleri  | 67 |
| 4.21. <i>HaeIII</i> ile kesim sonrası elde edilen 33-49 no'lu suşların 196 ve 524 bp'lik <i>OXA-10</i> gen bölgeleri | 68 |
| 4.22. <i>OXA-10</i> PCR ürünlerinin restriksiyon analizi basamakları   | 68 |
| 4.23. <i>P. aeruginosa</i> suşlarına ait grupları temsil eden PFGE profilleri  | 69 |
| 4.24. <i>P. aeruginosa</i> suşlarınının 11 adet grubunu temsil eden PFGE dendogramı                                  | 70 |

**TABLolar**

| <b><u>Tablo</u></b>  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--|---------------------|
| 2.1. <i>P. aeruginosa</i> ' da çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları            | 17                  |
| 2.2. <i>P. aeruginosa</i> ' da kazanılmış direnç mekanizmaları                         | 18                  |
| 2.3. <i>P. aeruginosa</i> ' da bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar          | 19                  |
| 2.4. Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar                      | 25                  |
| 2.5. İnfeksiyon etkenlerini tiplendirme yöntemleri                                     | 33                  |
| 2.6. Genotipleme yöntemlerinin karşılaştırılması                                       | 34                  |
| 2.7. Genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkisi                               | 37                  |
| 2.8. PFGE profillerinin yorumlama kriterleri   | 39                  |
| 3.1. Magnezyum klorür optimizasyonu  | 46                  |
| 3.2. Primer bağlanma ısı optimizasyonu   | 46                  |
| 3.3. <i>PER-1</i> gen bölgelerinin çoğaltılması için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı | 47                  |
| 3.4. <i>OXA-10</i> gen bölgesinin amplifiye edilmesi için gerekli reaksiyon karışımı   | 47                  |
| 3.5. Primer/oligonükleotid dizileri  | 50                  |
| 3.6. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin özellikleri                                 | 52                  |
| 4.1. Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar            | 57                  |
| 4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri       | 64                  |

## 1. GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) hastane ortamında sık görülmesi, mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olması ve birden fazla antibiyotik grubuna farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmesi nedeniyle hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir (Arman ve Uçan, 2004). *P. aeruginosa* suşlarında hücre duvarı dış membran geçirgenliğinin azalması ve yapısal aktif pompalama sistemleri doğal dirençte rol oynamaktadır (Pechere ve Köhler, 2000; Öncül, 2004). *P. aeruginosa*'da kazanılmış direnç mekanizmaları arasında en yaygın olanı aşırı beta-laktamaz salgılanmasıdır ve dirençte önemli rol oynamaktadır (Karadenizli ve Vahaboğlu, 2004).

Beta-laktamaz üretimi, özellikle gram-negatif bakterilerde beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır (Eraç, 2006). Plazmit kaynaklı beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2 ve SHV), başlangıçta penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken mutasyonlar sonucu genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) adı verilen ve son kuşak sefalosporinleri de hidrolize edebilen enzimler ortaya çıkmıştır (Sirot, 1995). Bu enzimi sentezleyen izolatlar sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve aztreonam gibi yeni kuşak beta-laktamlara ve ayrıca diğer grup antibiyotiklere de direnç göstermektedir (Öncül, 2004).

GSBL'lerin çoğu TEM veya SHV'den köken alan enzimlerdir. *PER-1* enzimi ise TEM ve SHV türevi enzimlerden farklı olarak, özellikle hastane infeksiyonlarında sık olarak karşılaşılan gram-negatif non-fermentatif bakterilerde bulunmakta ve penisilin, tikarsilin, seftazidim gibi anti-psödomonal antibiyotiklere dirençten sorumlu tutulmaktadır (Eraç ve Gülay, 2003). *PER-1* enzimi Türkiye'ye özgü bir enzim olarak *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.'lerde görülmektedir ve ilk kez bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır (Danel et al., 1995; Eraç, 2006).

TEM ve SHV grubu enzimlerden yapısal olarak farklı diğer bir enzim grubu olan OXA enzimleri, Doğu Avrupa ülkeleri ve özellikle Türkiye'ye özgü enzimler olarak bildirilmektedirler (Bush, 2001). OXA tipi GSBL'ler başlıca *P. aeruginosa*'da



bulunurlar. Bu grup enzimlerin ortak özellikleri; ampicilin, sefalotin, oksasilin ve kloksasiline direnç kodlamaları, klavulanik asitle inhibe olmamaları ya da çok düşük düzeyde inhibe olmaları ayrıca, üçüncü kuşak sefalosporinleri değişik derecelerde hidrolize edebilmeleridir (Bush et al., 1995; Bradford, 2001). *OXA-10* tipi GSBL enzimleri olarak ayrılan büyük alt grupta *OXA-10*'un türevleri olarak *OXA-11*, *OXA-13*, *OXA-14*, *OXA-16*, *OXA-17*, *OXA-19* ve *OXA-28* bulunmaktadır (Poirel et al., 2004). *OXA-11*, *OXA-13*, *OXA-14*, *OXA-16*, *OXA-17* ilk olarak ülkemizde tespit edilen beta-laktamaz türleridir ve *OXA-17*'nin sefotaksim, diğerlerinin de seftazidim direncine yol açtıkları gösterilmiştir (Hall et al., 1993; Danel et al., 1997).

Moleküler tiplendirme yöntemleri erken tanı ve antimikrobiyal direncin saptanmasının yanısıra, infeksiyon kontrolü açısından en önemli katkıyı epidemiyoloji alanında sağlamaktadır. Tür düzeyinde belirleme, infeksiyon hastalığının etiyojisini tanımlamada yeterli olabilmektedir ancak, izole edilen aynı tür içindeki birçok suşun epidemiyolojik yönden birbiriyle ilişkisinin olup olmadığının da saptanması gerekmektedir. Böylece etkenin transmisyon dinamiğini ve konak içindeki etkileşimlerini daha iyi tanımlamak mümkün olabilmektedir (Thompson, 2000). Genel olarak epidemiyolojik yönden ilişkili izolatlar, klonal olarak da ilişkili olup ortak bir kaynaktan köken alırlar (Durmaz, 2001).

Bu bilgiler ışığında; araştırmamızda hastane infeksiyonlarından elde edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direncinde rol oynayan *PER-1* ve *OXA-10* grubu genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleri kodlayan gen bölgelerinin saptanması ve bu enzimlerin genotiplerinin tespit edilmesi, *PER-1* ve *OXA-10* grubu enzim üreten izolatların klonal yakınlıklarının ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Farklı moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak etkenlerin hızlı ve güvenilir şekilde tanımlanması ile suşlar arasındaki klonal ilişkinin analiz edilmesinin, çoğul dirençli etkenlerin neden olduğu tedavi başarısızlığının engellenmesi ve hastane infeksiyonu olgularının kontrol altına alınmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

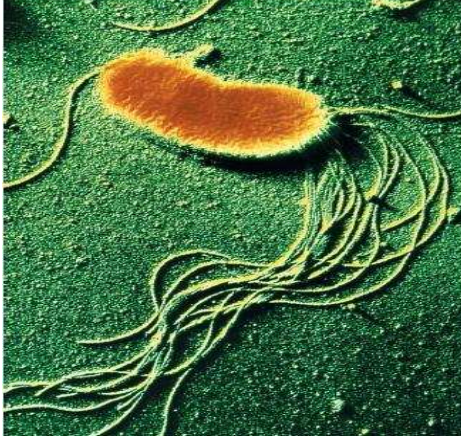
### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Doğada yaygın olarak bulunan, insan ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde hastalık yapmaksızın bulunabilen gram-negatif, nonfermentatif, aerobik basil olan *P. aeruginosa*; Pseudomonadaceae ailesindeki *Pseudomonas* cinsinin en önemli nozokomiyal patojeni ve en iyi tanımlanmış türüdür (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Erdem, 1999; Çıragil ve ark., 2002; Vahaboğlu ve Akhan, 2002). Önceden bu cinste bulunan bakteriler rRNA homolojilerine göre beş gruba ayrılmaktayken, son yıllarda sınıflandırılmaları yeniden düzenlenmiştir (Erdem, 1999). Böylece, önceden *Pseudomonas* cinsinde bulunan türlerin çoğu *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* cinslerine aktarılmıştır. *Pseudomonas* cinsi, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola* ve *P. oryzihabitans* olmak üzere yaklaşık 10 türü içermekte ve *P. aeruginosa* bu türler içinde en sık izole edilen bakteridir (Murray et al., 2002; Kıska ve Gilligan, 2003). Distile suda bile çoğalabilecek kadar minimal besin maddesine ihtiyaç duyması, sıcaklık dahil farklı fiziksel şartlara uyum göstermesi fırsatçı patojen olarak önemli rol oynamasına yardımcı olur (Brooks, 1998). *P. aeruginosa* suşları dezenfektan ve sıvı sabunlar, temizlik maddeleri, hasta odalarındaki çiçekler gibi birçok ortamdan izole edilmişlerdir (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

#### 2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

*Pseudomonas aeruginosa*; aerob ve sporsuz, ortalama 0.5-0.8 µm boyunda, düz ve hafif kıvrık gram-negatif basillerdir. Mikroskop altında tek tek, çift çift veya kısa zincirler şeklinde görülebilir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Pollack, 2000; Kıska ve Gilligan, 2003). Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiğe sahiptir ve bu nedenle çok hareketlidir (Vahaboğlu, 2000; Bakır, 2002). Şekil 2.1'de morfolojik yapısı gösterilmektedir. Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun, deforme ve

hareketsiz şekilleri görülebilir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Pollack, 2000; Kıska ve Gilligan, 2003).



**Şekil 2.1.** *P. aeruginosa*'nın morfolojik yapısı  
(<http://www.biomarker.cdc.go.kr/pseudomonasaeruginosa>)

### 2.1.2. Kültür Özellikleri

*Pseudomonas aeruginosa*'nın organik üreme faktörlerine gereksinimi yoktur (Pollack, 2000). Zorunlu aerob olarak bilinmesine rağmen nitrat ve arjinin varlığında bunları terminal elektron alıcısı olarak kullanarak anaerob koşullar altında da üreyebilir (Pitt, 1998; Kıska ve Gilligan, 2003). Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde çoğalır ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigment oluşturur. Laboratuvarlarda triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukolata agar, Mueller Hinton agar (MHA), endo agar ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir fakat 4 °C'de üreyemez, 42°C'de üreyebilme özelliği diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasında önemli bir özelliktir (Baron, 1990; Bilgehan, 1995; Brooks et al., 1998; Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

Laboratuvar koşullarında rutinde kullanılan bütün besiyerlerinde kolayca üreyerek 24-48 saat inkübasyon sonunda izole edilebilirler (Erdem, 1999; Pollack, 2000; Vahaboğlu ve Akhan, 2002). İzolatların çoğu kanlı agarda beta hemolitikdir ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur (Pitt, 1998; Erdem, 1999; Kıska ve Gilligan, 2003).

Bu bakteri, katı besiyerlerinde başlıca 3 tip koloni oluşturur. Tip 1 koloniler; yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, 2-3 mm çapındaki kolonilerdir ve klinik materyallerden üretilen *P. aeruginosa*'lar daha çok bu tip kolonileri oluştururlar. Tip 2 koloniler; küçük, kabarık, koliform kolonilere benzerdir. Tip 3 koloniler ise R koloni formundadır. Bu formların dışında mukoid, cüce, jelatinöz koloniler de görülebilir. Tip 1 ve 2 koloniler, tuzlu suda homojen süspansiyon oluştururken tip 3 koloniler granüler süspansiyon oluştururlar. Mukoid koloniler, sıklıkla kistik fibrozisli hastalarda görülmekle birlikte, bazen diğer kronik akciğer hastalığı olan kişilerdeki pulmoner infeksiyonlarda veya kateter kullanımına bağlı sekonder gelişen üriner sistem infeksiyonlarında da görülebilirler. Sıklıkla kistik fibrozisli hastaların balgamından izole edilen cüce koloniler, 48-72 saat inkübe edilmeden gözle değerlendirilemezler (Pitt, 1998; Bilgehan, 2000; Kısa ve Gilligan, 2003).

*P. aeruginosa*, bir kültürde koloni varyantlarının bir karışımını oluşturabilir ve karışık bir bakteri kültürü izlenimi verebilir. Bu koloni tipleri, farklı biyokimyasal özellik ile enzimatik aktiviteye ve farklı antibiyotik duyarlılık paternine sahip olabilir. Özellikle kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla görülen bu karışık koloni varyantları antibiyotik duyarlılık testlerinde sorun oluşturabilir (Brooks et al., 2001; Kısa ve Gilligan, 2003).

MacConkey agarda, laktöz negatif koloniler oluştururken, buyyonda yüzeyde zar yapmak üzere bol ve homojen ürer, zarın hemen altında mavi-yeşil pigment oluşumu görülür (Bilgehan, 2000; Forbes et al., 2002; Kısa ve Gilligan, 2003). Bu özellik *P. aeruginosa* identifikasyonunu doğrular ve kültürlerin çoğunda, triptofandan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak tatlı ve üzüm benzeri koku oluşturması karakteristik özelliğidir (Pitt, 1998; Erdem, 1999).

### **2.1.3. Seçici Besiyerleri**

Setrimid, asetamid, nitrofurantoin ve 9-chloro-9-diethylaminphenyl-10-phenyl acridin içeren besiyerleri, özellikle nozokomiyal *Pseudomonas* infeksiyonu gelişme riski taşıyan hastalarda ve bu nedenle gastrointestinal kolonizasyonun önem taşıdığı

durumlarda kullanılmaktadır (Pitt, 1998; Bilgehan, 2002; Vahaboğlu ve Akhan, 2002; Kıska ve Gilligan, 2003).

#### 2.1.4. Pigmentleri

*P. aeruginosa*'da, piyosiyenin, piyoverdin veya floresein, piyorubin ve piyomelanin olmak üzere en az dört farklı pigment tanımlanmıştır (Pitt, 1998). *P. aeruginosa*'ya özgü bir pigment olan piyosiyenin, mavi bir fenazin boyası olup suda ve kloroformda çözünür. Bu pigmentin oluşumu üreme ortamına bağlıdır ve *P. aeruginosa* kökenlerinin %90'ından fazlasında bulunmaktadır (Bilgehan, 2000). Piyoverdin, kloroformda çözünüp suda çözünmeme özelliği ile piyosiyeninden ayrılmaktadır. Fluorescein pigmentini, *P. aeruginosa*'lar olarak bilinen grubun *P. fluorescens*, *P. putita*, *P. veronii* ve *P. monteilii* gibi diğer üyeleri de oluşturabilir. Kültürlerde sarımsı renk oluşturur fakat ultraviyole ışık altında sarı-yeşil veya sarı-kahverengi olarak görülür (Pitt, 1998; Bilgehan, 2000; Forbes et al., 2002; Kıska ve Gilligan, 2003). Bazı türler, parlak kırmızı ve suda eriyen pigment olan piyorubin oluştururlar. Başlıca idrar ve kistik fibrozis hastalarının balgam örnekleri olmak üzere klinik izolatların %2'si bu pigmenti üretirler. Piyomelanin ise kahverengi-siyah bir pigmenttir ve *P. aeruginosa* izolatlarının ancak %1'den azı tarafından oluşturulur (Pitt, 1998).

Mueller-Hinton agar veya triptik soy agar gibi boya içermeyen besiyerlerinde değerlendirilen pigmentasyon oluşumu, kültürler inkübatörden çıkarılıp oda ısısında (18-22 °C) 3-4 saat bekletildiğinde artmaktadır (Pitt, 1998; Bilgehan, 2000; Forbes et al., 2002).

#### 2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri

*P. aeruginosa* karbonhidratları fermente etmediğinden glukoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken maltoz, laktoz ve sukroza etki etmez. İndefenol oksidaz, katalaz, sitrat, L-arjinin dihidrolaz pozitifken, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir. İndol ve hidrojen sülfür oluşturmaz, metil-kırmızısı ve Vogler-Proskauer testi ise olumsuzdur. Nitratlardan gaz oluşturur, jelatini hidrolize eder

ve potasyum siyanür'e dirençlidir (Erdem, 1999; Pollack, 2000; Bilgehan, 2000; Bilgehan, 2007).

### 2.1.6. İdentifikasyonu

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerinin %95'inden fazlası tipik büyük beta-hemolizli koloni görünümüne, kendine özgü tatlı ve üzüm benzeri kokusuna, pyocyanin üretimi ile kolonilerin 10 saniye içinde oksidaz pozitif olmasına göre pozitif olarak tanımlanır (Koneman et al., 1997; Murray et al., 2002). *P. aeruginosa* 42 °C' de üreyebilme özelliği ile diğer tiplerinden ayrılır (Kıska ve Gilligan, 2003).

*P. aeruginosa*'nın mukoid veya cüce koloni oluşturan varyantların çoğunun pigment oluşturmaması, atipik biyokimyasal profil göstermesi ve biyokimyasal reaksiyonlarının geç oluşması identifikasyonlarını zorlaştırır. Negatif sonuç verilmeden önce 7 gün bekletilmesi gerektiğinden, biyokimyasal testlerdeki bu yavaş aktivite ticari sistemlerle identifikasyonu da önler. Kirpik boyama yöntemi çoğu kez identifikasyon için gerekli değilken bu olgularda yararlı olabilir (Koneman et al., 1997; Forbes et al., 2002).

*Pseudomonas* spp. identifikasyonunda, çoğu laboratuvarında geleneksel yöntemlerden başka ticari sistemler kullanılmaktadır. Glukozu fermente etmeyen gram-negatif basillerin identifikasyonu için çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir. Bunlar; Vitek Gram-negatif ID (GNI) ve API 20NE (bioMerieux Vitek), N/F ve RapID NF Plus (Remel, Inc., Lenexa, Kans.), MicroScan W/A Neg Combo Panel (Dade Behring Micro Scan, Inc., Deerfield, III.) ve Crystal E/NF (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md.) gibi sistemlerdir (Kıska ve Gilligan, 2003).

### 2.1.7. Epidemiyolojisi

*P. aeruginosa*, özellikle insan ve hayvan atıkları ile kontamine organik materyal içeren ılık nemli yerlerde, su yüzeylerinde, toprakta ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (Kıska ve Gilligan, 2003). Dezenfektanlar dahil olmak üzere çok farklı yerlerden izole edilebilir, üremesi için çok az besin maddesine ihtiyaç duyar ve distile

su içinde bile üreyebilir. *P. aeruginosa*'nın farklı fiziksel koşullara çok kolay uyum göstermesi, birçok antibiyotiğe ve dezenfektanlara dirençli olması etkili bir fırsatçı patojen olma özelliği kazandırır (Pollack, 2000; Turgut ve ark., 2002).

*P. aeruginosa* sık olmamakla birlikte sağlıklı insanların normal florasında da bulunur. Doğada olduğu gibi vücutta da nemli bölgelerde kolonize olma eğilimindedir. Kolonizasyon oranı; deride %0-2, burun mukozasında %0-3.3, boğaz mukozasında % 0-6.6, gaitada diyetten etkilenmekle birlikte %2.6-24'tür. Hastanede yatan hastalarda her bir örnekteki kolonizasyon oranı %50'ye kadar çıkmaktadır (Pollack, 2000).

Hastanelerde salgınlara yol açtığından ve kistik fibrozisli hastalarda akciğer infeksiyonlarındaki rolünden dolayı, epidemiyolojik araştırmalar için çeşitli tiplendirme sistemleri geliştirilmiştir. Serotiplendirme, antibiyogram, faj tiplendirme ve biyotiplendirme gibi geleneksel metodlar, kökenlerin tam olarak tiplendirilmesinde yeterli olamamaktadır. Günümüzde ribotiplendirmede altın standart olarak kabul edilen "pulsed-field jel elektroforez" (PFGE) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'na dayalı moleküler yöntemler bu metodların yerini almıştır (Kıska ve Gilligan, 2003).

Son yıllarda *Pseudomonas* infeksiyonlarının hastane ortamında gittikçe arttığı gözlenmektedir (Tuncer ve Akova, 1997). Değişik çalışmalarda, hastane infeksiyonlarından %8-25 oranında bu bakterinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Özellikle, Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ) ve nötropenik hastaların bulunduğu servislerde daha sık olarak görülmektedir (Usluer, 2002). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde "National Nosocomial Infections Surveillance System" (NNIS) çalışmalarının 1990-1996 yılları arasındaki hastane infeksiyonu verilerine göre; pnömonilerde ikinci (%17), üriner sistem infeksiyonlarında üçüncü (%11), cerrahi alan infeksiyonlarında dördüncü (%8) ve bakteriyemilerde yedinci sırada (%3) izole edilmiştir. *Pseudomonas* infeksiyonlarının tüm hastane infeksiyonlarında ise beşinci sırada (%9) olduğu bildirilmiştir (Pollack, 2000).

Asya, Avrupa, Latin Amerika ve ABD/Kanada olmak üzere, dünyanın dört farklı bölgesinde 1997-2001 yılları arasında 18569 nonfermentatif gram-negatif izolatın değerlendirildiği SENTRY çalışmasında, *Pseudomonas*lar %64.5 oranında en sık izole edilen nonfermentatif gram-negatif basil olarak bildirilmiştir (Jones et al., 2003).

Ülkemizde ise hastanemizin de dahil olduğu sekiz hastanenin YBÜ' lerinden izole edilen gram-negatif bakterilerin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada, *P. aeruginosa* %24.6 oranı ile en sık izole edilen gram-negatif bakteri olarak bildirilmiştir (Aksaray ve ark., 2000). Yine hastanemizin de dahil olduğu 16 hastanenin YBÜ' lerinden, son 5 yıllık verilerin değerlendirildiği çalışmada ise *P. aeruginosa*'nın %28.2 oranı ile en yaygın gram-negatif bakteri olduğu belirlenmiştir (Leblebicioğlu ve ark., 2002).

### 2.1.8. Patogenezi

*P. aeruginosa*, fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmekte ve sağlıklı kişilerde nadiren enfeksiyona neden olmaktadır. İmmünitesi sağlam konakçılarda enfeksiyona yol açan bakterilerde görülen virülans faktörlerinin çoğuna sahip olmasına rağmen fırsatçı bir patojen olmasıdır. Bu özelliğinin muhtemelen enfeksiyon oluşumu için gerekli olan ilk aşamaları geçmedeki yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Salyers ve Witt, 1994; Erdem, 1999; Pollack, 2000).

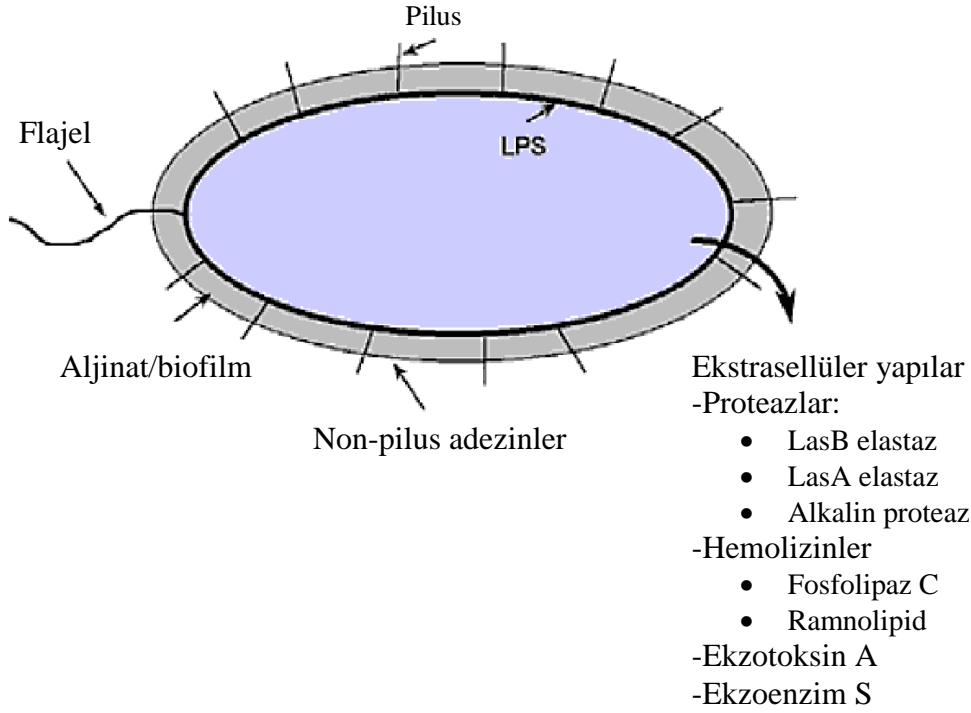
*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının oluşması için konakçı savunma mekanizmasının değişmiş olması gereklidir (Delden ve Iglewski, 1998). Genellikle yanıklı hastalarda, kanser kemoterapisi alanlarda, HIV enfeksiyonu olanlarda, nötropenik hastalarda, uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik kullanımıyla mikrobiyal florası değişenlerde, savunma mekanizmalarında değişiklik olanlarda ve üriner kateter veya entübasyon uygulananlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (Piddock ve Turner, 1992).

*Pseudomonas* enfeksiyonlarının patogenezinde invaziv ve toksijenik özelliklerinin her ikisi birlikte rol oynar. Enfeksiyonlar bakteriyel bağlanma ve kolonizasyon, lokal invazyon, yayılma ve sistemik hastalık şeklinde üç aşamada gerçekleşir (Delden ve Iglewski, 1998).



### 2.1.9. Virulans Faktörleri

*P. aeruginosa*'nın virulans faktörleri arasında; pigment, hemolizinler, ekzotoksin A, ekzoenzim S, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adezinleri ve aljinat gibi yapılar sayılabilir. Şekil 2.2'de virülans faktörler gösterilmektedir. Bunlar bakterinin konağa yerleşmesine ve konağa ait hücreleri hasara uğratmasına yardımcı olurlar (May et al., 1991).



Şekil 2.2. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri

#### 2.1.9.1. Yüzey Adezinleri

*P. aeruginosa*'nın yüzeyinde pili ve nonpili hücre yüzey komponentleri olmak üzere iki tip protein adezini tanımlanmıştır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir (Salyers ve Witt, 1994; Erdem, 1998). Bakterinin pili aracılığı ile tutunması, immün sistemi baskılanmış hastaların üst solunum yollarının kolonizasyonunda önem kazanırken aljinata bağlı tutunma, mukosilyer atılımın hasar görmüş alt solunum yollarının epitel kolonizasyonunda ilk basamağı oluşturmaktadır. *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları hasar görmemiş normal trakeal epitel hücrelerine nonmukoid suşlardan daha fazla

miktarda bağlanır (Doig et al., 1989; Baron ve Finegold, 1990; Denton ve Wilcox, 1997). *P. aeruginosa* pilileri epitelyal yüzeylere bağlanırken musine bağlanma nonpilus adezinlerle sağlanır (Salyers ve Witt, 1994).

### 2.1.9.2. Aljinat (Mukoid Ekzopolisakkarit)

*P. aeruginosa*'nın aljinatı anyonik bir polisakkarittir ve antifagositik etkiye sahiptir. Bu etki nötrofillerin kemotaksisinin inhibisyonu, komplemanın alternatif yoldan aktive olması ve bakteriye karşı zayıf opsoninlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır (Pitt, 1989).

*P. aeruginosa*, mukoid ekzopolisakkarid veya glikokaliks olarak da bilinen birçok fonksiyona sahip polisakkarid bir kapsül oluşturur. Kapsül, aljinat adı verilen tekrarlayan yapılarda mannuronik asit ve glukuronik asitten oluşur (Pollack, 2000).

### 2.1.9.3. Pigmentleri

*P. aeruginosa* kökenlerinin büyük çoğunluğu yeşil renkli floresein ve turkuaz mavisi renkli piyosiyenin pigmenti oluşturur (Baron ve Finegold, 1990; May, 1991; Otkun, 1998). Bazı *P. aeruginosa* suşlarının ise sarı renkli piyoverdin, kırmızı renkli piyorubin veya kahverengi piyomelanin pigmenti yaptıkları saptanmıştır. Bu suşlar besiyerlerinde sarı-yeşil, mavi-yeşil, kırmızı, mor ya da kahverengi üremeleriyle ayırt edici özellik kazanırlar (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Brooks et al., 1998).

### 2.1.9.4. Hemolizinler

Fosfolipaz C ve ramnolipid, *P. aeruginosa*'nın hemolizinleridir. Fosfolipaz C, ısıya duyarlı bir protein, ramnolipid ise ısıya dayanıklı bir glikolipiddir. Bu ikisi sinerjistik hareket ederek lipidleri ve lesitini hasara uğrattırlar. Nekroz yaparak bakterinin doku invazyonuna yardım ederler ve özellikle ramnolipid, solunum sisteminde silier aktivitenin inhibisyonuna neden olur (Erdem, 1999; Murray et al., 2002).

### 2.1.9.5. Ekzotoksin A

*P. aeruginosa*'nın patojenik kökenleri tarafından üretilen Ekzotoksin A; kornea, yanık, yara ve akciğer infeksiyonlarında en önemli virülans faktörlerinden birisidir (Murray et al., 2002). Ekzotoksin A'nın monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırması bu bakteri ile enfekte hastalarda oluşan kronik akciğer infeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır. Kronik akciğer infeksiyonlarında bakterinin nonmukoid fenotipinin mukoid şekle dönüşmesi sonucu kandaki ekzotoksin A'nın miktarı geriye dönüşümlü olarak belirgin bir şekilde azalmaktadır (Que ve Woods, 1987; Baron ve Finegold, 1990; Woods et al., 1991). Ekzotoksin A, adenozin difosfatın transferini katalize eder, ayrıca lokal doku hasarından, bakteriyel invazyondan ve muhtemelen immunsupresyondan sorumludur. Elongasyon faktör-2 (EF-2)'yi inaktive ederek protein sentezinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Delden ve Iglewski, 1998; Erdem, 1999).

### 2.1.9.6. Ekzoenzim S

Ekzoenzim S; Ekzotoksin A gibi bir adenozin difosfat ribozil transferazdır. Hedef proteini tam olarak tanımlanamamış olmakla birlikte epitelial hücre hasarına, doku invazyonuna, bakteriyel yayılıma ve nekroza neden olur (Erdem, 1999; Murray et al., 2002). Sadece ekzotoksin A veya ekzoenzim S oluşturan suşlara göre her ikisini de oluşturan suşlarla enfekte olan hastalarda mortalite oranı daha yüksektir. Ekzoenzim S oluşturan suşlarla oluşan infeksiyonlarda mortalitenin daha yüksek olması, bu enzimin *P. aeruginosa*'nın etken olduğu progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını göstermektedir (Sokol et al., 1981; Woods ve Sokol, 1985; Baron ve Finegold, 1990).

### 2.1.9.7. Proteazlar

Alkali proteaz ve elastaz, *P. aeruginosa* infeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan jelatini, kazeini, laminini ve immüoglobulinleri parçalayan proteazlardır. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır (Wretlind ve Paulovskis, 1983; Colin et al., 1997; Yağcı ve ark., 2002). Las-A (serin proteaz) ve Las-B (çinko metalloproteaz) elastazlar, sinerjistik etkiyle elastanın yıkımına neden olurlar, deri, akciğer ve korneada nekrotizan etkiye sahiptirler (Murray

et al., 2002). Elastazlar kan damarlarındaki internal elastik laminayı yıkarak hemorajilere neden olurlar, aynı zamanda *Pseudomonas* sepsisinde görülen ektima gangrenozumdan da sorumludurlar (Vahaboğlu ve Akhan, 2002). Alkalın proteaz, elastazlara benzer şekilde doku yıkımına ve bakterinin yayılmasına neden olur (Murray et al., 2002).

#### **2.1.9.8. Endotoksin**

*P. aeruginosa*' da bulunan lipopolisakkarid endotoksin önemli bir hücre duvarı antijenidir. Endotoksinin lipid A komponenti, sepsis sendromundaki çeşitli biyolojik etkilerden sorumludur (Murray et al., 2002).

#### **2.1.10. Klinik Önemi ve Oluşturduğu İnfeksiyonlar**

*P. aeruginosa*, yüzeysel bir deri infeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli infeksiyonlara neden olabilir (Kıska ve Gilligan, 2003). İnfeksiyonları, yüksek mortalite ile seyreder (Vahaboğlu, 2000).

Nötropenili ve mekanik ventilasyonlu hastalardaki pnömonilerde, kistik fibrozisli hastalardaki akut alevlenmelerde, HIV ile infekte kişilerdeki infeksiyonlarda, intravenöz ilaç bağımlısı olanlarda prostetik kapak endokarditlerinde, diabetik hastalardaki malign otitis eksternalarda, kafatası bazisi kırıklarında, cerrahi operasyonları sonrası gelişen beyin abselerinde, nozokomiyal menenjitlerde, göz cerrahisi ve kontamine lens kullanımına bağlı endoftalmitlerde, osteomyelitlerde, şiddetli yanıklardaki yumuşak doku infeksiyonlarında ilk planda düşünülmesi gereken önemli patojenlerden birisidir (Giamarellou, 2002).

### 2.1.10.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları

Solunum yollarının ilk kolonizasyonu nonmukoid *Pseudomonas* suşlarıyla olmakla birlikte, bazı çevresel koşulların baskısı altında bu suşlar mukoid fenotipe dönüşerek akciğer infeksiyonlarında dominant hale geçmektedirler (Schultz ve Müller, 1974; Mc Awoy et al., 1989; Baron ve Finegold, 1990). *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları kistik fibrozlu hastalarda 1 yaşın altında %21 oranında, 26 yaşın üzerinde ise %80'e kadar yaşla birlikte artan oranda alt solunum yolu infeksiyonuna neden olur. Progresif akciğer infeksiyonu oluşmasında *P. aeruginosa* kritik bir role sahiptir (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

*P. aeruginosa*'nın aljinat üretimiyle oluşturduğu biyofilm, kronik akciğer infeksiyonlu kistik fibroz hastalarında sıklıkla görülür. Biyofilm oluşumuyla bakteri hastanın immün sistemine ve birçok antibiyotiğe karşı korunmuş olur. Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere daha dirençlidirler ve eğer bakteri biyofilm oluşturmuşsa antimikrobiyal ilaçların minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri 100 ila 1000 kat artabilir (Wozniak et al., 2003; Stapper et al., 2004). Mukoid *P. aeruginosa* suşları ile enfekte kistik fibrozlu hastaların bronşiyal sıvılarında bulunan immün komplekslere bağlı doku hasarının yanı sıra, fagositik hücre ve bakteri orijinli proteolitik enzimler de doku hasarına neden olabilmektedirler (Baron ve Finegold, 1990; Nivens et al., 2001; Stapper et al., 2004).

**2.1.10.2. Septisemi:** Yenidoğanda, AIDS ve kanser hastaları gibi immunosupresif ilaç alan bireylerde, yara veya yanık gibi çeşitli lokal infeksiyonlardan kaynaklanarak ortaya çıkmaktadır ve ölüm oranı çok yüksektir. Hastalık sırasında vezikül, bül ve sonunda ektima gangrenozum adı verilen hemorajik ve nekrotik yaralar şeklinde döküntüler görülür. Bunların oluşumu kapiller damarlardaki *P. aeruginosa*'ların deriye lokalizasyonu ile gerçekleşir (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995).

**2.1.10.3. Endokardit:** *P. aeruginosa* protez kalp kapağına ve ilaç bağımlılarında ise doğal kalp kapağına yerleşerek enfektif endokardite neden olabilmektedir. Triküspid kapak tutulumu daha sık olmakla birlikte pulmoner, aortik veya mitral kapak tutulabilir (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.4. Menenjit:** Çoğu kez lomber ponksiyon ya da anestezi sırasında bakterinin kontamine iğne veya eriyiklerle BOS'a verilmesi sonucunda oluşan ağır pürülan menenjit gelişir. Septisemi sırasında kan yolu ile bakterinin meninkslere ulaşması da menenjite neden olabilmektedir (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.5. Yanık ve yara infeksiyonları:** Çeşitli yollarla bulaşan bakteriler yara ve yanıklarda lokal ve çoğu kez mavi yeşil renkte püy şeklinde görülen infeksiyonlara neden olur. Ağır yanıklarda deride hakim olan gram pozitif flora yerini gram negatif çomaklara ve özellikle *P. aeruginosa*'ya bırakır. Yanıklı hastalardaki *Pseudomonas* sepsisinde tedavideki tüm gelişmelere karşın mortalite %78 gibi çok yüksek bir orandadır (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.6. İdrar yolu infeksiyonları:** Bulaşma çoğu kez yatan hastalarda *P. aeruginosa* ile kontamine sonda veya sistoskop gibi aletlerin kullanılması sonucu oluşur. Sistit ve bakterilerin yukarı idrar yollarına ulaşmaları sonucunda nozokomiyal piyelit ve piyelonefrit gelişir (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.7. Göz infeksiyonları:** Penetran travma sonrası göze yabancı cisim veya kontamine damlaların damlatılması ile konjonktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit gibi göz infeksiyonları şeklinde gelişebilen ve bazen görme kaybı ile endoftalmite neden olabilen infeksiyonlardır. Kontamine kozmetik ürünler, kontakt lensler ve lens solüsyonları sağlam gözde bile bu tür infeksiyonların oluşmasına neden olabilmektedir ve yenidoğanda damlacık infeksiyonları da bu şekilde sonuçlanabilir (Baron ve Finegold, 1990; Bilgehan, 1995; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.8. Kulak infeksiyonları:** *P. aeruginosa* dış kulak yolu normal florasında ender olarak bulunur. Yaralanma, maserasyon, enflamasyon veya sürekli nem ortamında eksternal otit adı verilen ve kendiliğinden iyileşebilen tabloya neden olabilir. Ağırlıklı olarak yaşlı ve diyabetik kişilerde, kısmen de damar hastalığı olan kişilerde malign eksternal otite neden olabilir (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.9. Kemik ve eklem infeksiyonları:** Hematojen infeksiyonlar genellikle intravenöz ilaç bağımlılarında; üriner sistem veya pelvik infeksiyonu sonrasında gelişir. Komşuluk yolu ile infeksiyon ise penetran travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku infeksiyonu sonrasında oluşur (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.10. Gastrointestinal sistem infeksiyonları:** *Pseudomonas* sepsisi için gastrointestinal sistem önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* bütün gastrointestinal sistemde kolonize olabilir ve yenidoğanlarda, hematolojik malinitesi olanlarda, kemoterapi gören nütropenik hastalarda infeksiyona neden olur (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

**2.1.10.11. Deri ve yumuşak doku infeksiyonları:** Yanık, travma, dekübit ülserleri veya dermatit ile bütünlüğü bozulmuş deride nem varlığında, primer diffüz veya lokalize *Pseudomonas* nedenli deri lezyonları meydana gelebilir (Baron ve Finegold, 1990; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

## **2.1.11. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnci**

*P. aeruginosa*, çevre koşullarına iyi uyum sağlayabilen, pekçok antiseptik ve dezenfektana karşı yüksek seviyeli direnç gösterebilen bakterilerden birisidir. *P. aeruginosa* dış membran lipopolisakkarit içeriğinin diğer gram-negatif bakterilerden farklı oluşu ve biyofilm oluşturması dörtlü amonyum bileşenleri, heksaklorofenli sabunlar, iyotlu solüsyonlar ve dezenfektanlara dirençli olmasına yol açar (Erdem, 1999; Öztürk, 2002). *Pseudomonas*' ların dezinfeksiyonunda fenoller ve beta-gluteraldehit etkili olabilir (Erdem, 1999; Şencan, 2003).

### 2.1.12. Antibiyotiklere Direnci

Tüm dünyada *P. aeruginosa* infeksiyonlarında antibiyotiklere direnç oranları artmakta, kullanılacak antibiyotik sayısı giderek daha da sınırlanmakta ve kullanılacak yeni bir antibiyotik bulunamamaktadır (Quinn, 1998; Hanberger et al., 1999; Carmeli et al., 1999; Leblebicioğlu ve ark., 2002; Livermore, 2002; Eldere, 2003). Böylece tedavi edilemeyen *Pseudomonas* infeksiyonları giderek artmakta ve özellikle YBÜ'lerinde, kistik fibrozisli veya infeksiyona duyarlı hastalarda ölüme neden olmaktadır (Durupınar, 2001). *P. aeruginosa*'da antibiyotiklere direnç hızla ve birden fazla mekanizmayla gelişir (Özsüt ve Gün, 1998). Bu bakterinin çeşitli antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Gülay, 2003).

**Tablo 2.1.** *P. aeruginosa*' da çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları (Gülay, 2003)

| Etkilenen Antibiyotik                                  | Mekanizma  |
|--|--|
| Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar | *İndüklenebilir Amp C tipi kromozomal beta-laktamazlar<br>*Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) |
| Karbapenemler  | *OprD kaybı ve AmpC tipi enzimin aşırı üretimi<br>*Plazmid kökenli metalloenzimler                       |
| Aminoglikozidler                                       | *Aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler<br>*Aktif pompa sistemleri                                   |
| Kinolonlar   | *DNA giraz A mutasyonları<br>*Aktif pompa sistemleri   |
| Çoğul direnç   | *Aktif pompa sistemleri ve hücre duvar geçirgenliğinin düşük olması                                      |

#### 2.1.12.1. Doğal Direnç Mekanizmaları

*P. aeruginosa* ampicilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kuşak sefalosporinler, ikinci kuşak sefalosporinler, sefotaksim, nalidiksik asit, trimethoprim gibi çok sayıda antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir (Livermore et al., 2001). Bu doğal dirençte, bakterinin dış membran geçirgenliğinin az olması ve yapısal olarak bulunan aktif pompalama sistemleri arasındaki sinerji anahtar rol oynar (Schweizer, 2003). Minimal seviyede sentez edilmesine rağmen AmpC tipi beta-laktamazlar; penisilin



G'ye, aminopenisilinlere, birinci kuşak sefalosporinlere ve beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlara doğal dirence neden olur (Durmaz ve Ağel, 2001).

### 2.1.12.2. Kazanılmış Direnç Mekanizmaları

*P. aeruginosa*'ya karşı bazı penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar etkilidir, fakat bakterinin mutasyonel dirence eğilimi bu ilaçların etkin kullanımını sınırlamaktadır

**Tablo 2.2.** *P. aeruginosa*'da kazanılmış direnç mekanizmaları (Livermore, 2002)

| Mekanizma                  | Antipsödomonal ilaca etki |     |          |         |          |         |     |      |     |    |
|----------------------------|---------------------------|-----|----------|---------|----------|---------|-----|------|-----|----|
|                            | Mutasyon Bölgesi          | Fq  | Carb-Tic | Pip-Azi | Czid-Atm | Cpm-Cpr | İmi | Mero | Agl | Pm |
| Afinite azalması           |                           |     |          |         |          |         |     |      |     |    |
| Topoizomeraz II            | gyrA                      | r/R | -        | -       | -        | -       | -   | -    | -   | -  |
| Topoizomeraz IV            | parC                      | r/R | -        | -       | -        | -       | -   | -    | -   | -  |
| AmpC'ni derepresyonu       |                           |     |          |         |          |         |     |      |     |    |
| Kısmi                      | ampD                      | -   | R        | R       | R        | r       | -   | -    | -   | -  |
| Tam                        | ampD+diğer                | -   | R        | R       | R        | R       | -   | -    | -   | -  |
| 'Up regülasyon'            |                           |     |          |         |          |         |     |      |     |    |
| MexAB-OprM                 | MexR'de nalB              | R/R | R        | r/R     | r/R      | r/R     | -   | r    | -   | -  |
| MexCD-OprJ                 | nfxB                      | r/R | r/R      | r/R     | r/R      | R       | -   | r    | -   | -  |
| MexEF-OprN                 | mexT'de nfxc              | r/R | r/R      | r/R     | r/R      | r/R     | r   | r    | -   | -  |
| MexXY-OprM                 |                           | r/R | r/R      | r/R     | r/R      | r/R     | -   | r    | r/R | -  |
| Agl transportunun azalması |                           | -   | -        | -       | -        | -       | -   | -    | r/R | -  |
| OprD kaybı                 | oprD; mexT'de nfxc        | -   | -        | -       | -        | -       | R   | r    | -   | -  |
| Membran deęişikleri        |                           | -   | -        | -       | -        | -       | -   | -    | -   | R  |

**Not:** Agl, aminoglycoside; Azl, azlocillin; Atm, aztreonam; Carb, carbenicillin; Czid, ceftazidime; Cpr, cefpirome; Fq, fluoroquinolone; İmi, imipenem; Mero, meropenem; Pip, piperacilline; Pm, polymyxin; Tic, ticarcillin; r, duyarlılıkta azalma, R, belirgin direnç

PSE-1 ile PSE-4'tür ve bu enzimler klasik TEM tipi enzimlere benzer şekilde antipsödomonal penisilinlere, sefaperazona ve sefsulodine direnç oluştururlar (Livermore, 2002). Bu enzime sahip izolatlar, sıklıkla dış membranda geçirgenlik azalması ve aktif pompa sistemi ile beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlara da direnç kazanırlar (Livermore, 1995).

*P. aeruginosa*'da, dirençte daha fazla göz önünde bulundurulması gereken enzimler Tablo 2.3'de verilmektedir(Livermore, 2002). Bunlardan *PER-1* enzimi, ilk kez 1992'de Paris'de bir Türk hastanın idrarındaki *P. aeruginosa*'da bulunmuştur ve *PER-1* üreten kökenler sıklıkla Türkiye'den bildirilmektedir (Nordmann et al., 1993; Vahaboğlu ve ark., 1997). Bu enzimi üreten kökenler, seftazidime dirençli, klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdırlar, piperasiline ise düşük düzeyde direnç gösterirler (Bakır, 2002; Öngen, 2003).

Diğer bir enzim grubu olan OXA tipi GSBL'ler de sıklıkla Türkiye'den bildirilmektedir (Danel et al., 1995; 1997; 1998). Bu enzim grubu, *OXA-10* mutantları olan; *OXA-11*, -14, -16, -17, -19, -28 ile *OXA-2* mutantı olan *OXA-15*'i içerir. Tümü oksiiimino-aminotiazolil sefalosporinlere, monobaktamlara ve penisilinlere direnç oluşturur (Livermore, 2002). Seftazidime direnç sağlayan OXA tipi GSBL enzimlerinin tersine, *OXA-17* sefotaksim ve seftriakson direncine neden olur (Bakır, 2002).

**Tablo 2.3.** *P. aeruginosa*'da bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (Livermore, 2002)

| Enzimler                                | Bulunduğu ülkeler  | Kodlandığı yer                          | İlaçlara direnç |         |      |         |     |          | İnhibisyon |       |
|---|--|---|-----------------|---------|------|---------|-----|----------|------------|-------|
|   |  |   | Carb-Tic        | Pip-Azl | Czid | Cpm-Cpr | Atm | İmi-Mero | Clv        | Taz   |
| <i>PER-1</i>                            | Türkiye<br>İtalya,Fransa,Belçika   | Plazmidler,<br>Kromozom                 | R               | r       | R    | R       | R   | S        | Güçlü      | Zayıf |
| <i>OXA-11</i> ,<br>-14,-16,<br>-19, -28 | Türkiye ( <i>OXA-11</i> ,<br>-14,-16),<br>Fransa ( <i>OXA-19</i> ,<br>-28)                           | Plazmidler,<br>İntegrinler,<br>kromozom | R               | R       | R    | R       | R   | S        | Zayıf      | Zayıf |
| <i>OXA-15</i>                           | Türkiye  | Plazmidler                              | R               | R       | R    | R       | R   | S        | Zayıf      | Zayıf |
| <i>IMP-1/-9</i>                         | Japonya ( <i>IMP-1</i> ),<br>Kanada ( <i>IMP-7</i> )   | Plazmidler,<br>İntegrinler,<br>kromozom | R               | R       | R    | R       | S   | r/R      | Yok        | Yok   |
| VIM tipi enzimler                       | İtalya ( <i>VIM-1</i> ),<br>Fransa, Yunanistan,<br>Kore ( <i>VIM-2</i> ),<br>Tayvan ( <i>VIM-8</i> ) | Plazmidler,<br>İntegrinler,<br>kromozom | R               | R       | R    | R       | S   | r/R      | Yok        | Yok   |

**Not:** **Azl**, azlocillin; **Carb**, carbenicillin; **Clv**, clavulanate; **Cpm**, cefepime; **İmi**, imipenem; **Czid**, ceftazidime; **Mero**, meropenem; **Pip**, piperacilline; **Taz**, tazobactam; **Tic**, ticarcillin; **r**, duyarlılıkta azalma; **R**, belirgin dirençli; **S**, duyarlı

## 2.2. Antipsödomonal Antibiyotikler

Üreidopenisilinler gibi bazı penisilinler, seftazidim ve sefepim gibi geniş spektrumlu üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler, aztreonam, aminoglikozidler ile kinolonlar, İndüklenebilir beta-laktamaz (IBL) enzimi düşük düzeyde sentezlendiğinde dahi etkinliklerini koruyabildiklerinden antipsödomonal antibiyotikler olarak adlandırılırlar. Genellikle yaşamı tehdit eden ciddi *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde bu ilaçlardan ikisinin kombinasyonunun kullanılması gerekmektedir (Giamarellou ve Antoniadou, 2001; Kuruüzüm, 2003). Bu grup antibiyotiklerin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, bakteri hücre duvarı sentezinin son aşaması olan transpeptidasyonu engelleyerek peptidoglikan sentezini inhibe ettikleri düşünülmektedir. Hücre duvarında penisilin bağlayan protein (PBP) reseptörlerine bağlanırlar. Ayrıca, bakteri hücrelerinde murein hidrolaz denilen otolitik enzimleri de aktive ederek peptidoglikanı parçalarlar (Çolak, 1999; Chambers, 2000).

### 2.2.1. Sefalosporinler

Bu grup ilaçlar, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerden bazılarını içerirler (Giamarellou ve Antoniadou, 2001). Sefalosporinler, bir beta-laktam halkası ve buna bağlı altılı dihidrotiazin halkasından oluşurlar (Gülay, 2003). Penisilinler gibi bakteri hücre duvarının peptidoglikan sentezini inhibe ederek etkili olurlar (Çolak, 1999).

Dördüncü kuşak sefalosporinlerden sefoperazon, sefsulodin ve seftazidim antipsödomonal aktiviteye sahiptir. Sefsulodin, dar spektrumlu bir üçüncü kuşak sefalosporindir ve *P. aeruginosa*'ya karşı azlosilin, piperasilin ve sefaperazondan daha etkilidir. Seftadizim ise en yüksek intrinsik aktiviteye sahiptir (Giamarellou ve Antoniadou, 2001). Dördüncü kuşak sefalosporinler üçüncü kuşak sefalosporinlere göre bazı GSBL'lere daha dayanıklıdırlar (Leblebioğlu, 2003).

### 2.2.2. Aztreonam

Astreonam yapısında bir beta-laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta-laktamlardan ayrılır (Gülay, 2003). Diğer beta-laktam antibiyotiklerle aynı etki mekanizmasına sahiptir ve başlıca PBP3'e bağlanarak etkili olur (Alp ve Doğanay, 2003). Beta-laktamaz enzimlerinin indüksiyonuna yol açmaz ve bu enzimlerin çoğuna dirençlidir (Giamarellou ve Antoniadou, 2001; Yao ve Moellering, 2003).

### 2.2.3. Karbapenemler

Karbapenemler, mevcut antibiyotikler içinde en geniş etki spektrumuna sahip beta-laktam antibiyotiklerdir ve gram-pozitif ile gram-negatif bakterilerdeki PBP'lere bağlanarak hücre lizisine neden olurlar (Yao ve Moellering, 2003). İmipenem ve meropenemin PBP'lere afinitesi bakteri türleri arasında bazı farklılıklar gösterir. GSBL'ler ve AmpC tipi beta-laktamazlar dahil olmak üzere çeşitli beta-laktamazların hidrolizine dayanıklıdırlar (Chambers, 2000; Shah ve Isaacs, 2003). Meropenemin kromozomal beta-laktamazları indükleyici etkisi de imipenemden daha zayıftır (Özyurt ve ark., 1998; Giamarellou ve Antoniadou, 2001). İmipenem ve meropenemin etki spektrumları arasında büyük bir fark olmamakla birlikte, gram-pozitif bakterilere karşı imipenem daha etkiliyken gram-negatif bakterilere özellikle de *P. aeruginosa*'ya karşı meropenem daha etkilidir (Piddock ve Turner, 1992; White et al., 1996; Yao ve Moellering, 2003). Son yıllarda *P. aeruginosa*'ların beta-laktamlara karşı artan direnci nedeniyle hastane infeksiyonları ve özel hasta populasyonlarında karbapenemlerin ilk seçenekler arasında düşünülmesi gündeme gelmiştir (Bradley et al., 1999; Oh E-J et al., 2003; Akçay ve ark., 2003).

### 2.2.4. Kinolonlar

Bakterisidal ajan olan kinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentezini inhibe ederler (Gülay, 2002). Klinik kullanımda *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili olan kinolonlar, siprofloksasin ve trovafloksasin'dir (Yao ve Moellering, 2003).

### 2.2.5. Aminoglikozidler

Gram- negatif bakterilere karşı ribozomların 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eden ve hücre duvarının permeabilitesinin bozan bakterisidal bir etkiye sahiptirler (Çolak, 1999; Gür, 2003). Türkiye’de yapılan bir çalışmada, aminoglikozidlere dirençli 150 adet *Pseudomonas* kökeni değerlendirilmiş ve gentamisin direnci %98.6, tobramisin direnci %84.6, amikasin direnci %58.6 olarak bildirilmiştir (Över ve ark., 2001).

### 2.2.6. Beta-Laktam Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

İlk bulunan antibiyotik grubu olan beta-laktamlar, yapılarına çeşitli kimyasal grupların eklenmesiyle etki spektrumlarının genişlemesi ve diğer antibiyotik gruplarına oranla yan etkilerinin az oluşu gibi nedenlerle tedavide ön plana çıkmaktadır (Özgüven, 2002).

Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması “moleküler benzerlik” temeline dayanır. Penisilin ve sefalosporinlerin moleküler yapısı, peptidoglikan zincirindeki D-alanil D-alanin’e yapısal benzerlik gösterir. Bu nedenle, PBP’ler beta-laktam ajanlarla etkileşip onları peptidoglikan zincirine eklemeye çalışırlar. Sonuçta peptidoglikan zincirinin sentezi durur ve otolizinlerin devreye girmesiyle hücre ölümü gerçekleşir (Özgüven, 2002). Çeşitli beta-laktam ajanların herbir PBP’e olan afiniteleri farklıdır ve birden çok PBP’e bağlanma özelliği nedeniyle bakterisidal aktiviteye katkıda bulunurlar (Koneman et al., 1997).

Beta-laktam ajanların yoğun kullanımına paralel olarak bu grup antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların sayıları da artmaktadır. Mikroorganizmalarda beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç PBP’lerde oluşan değişiklikler, ilacın hücre içine girişinin kısıtlanması, aktif pompa sistemleri, beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi yoluyla gelişmektedir (Eraç, 2006).

### 2.2.6.1. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Oluşan Değişiklikler

Tüm penisilin bağlayan proteinler birçok beta-laktamazla birlikte “serin peptidaz” ailesinin üyesidirler. PBP’ler ve beta-laktamazlar, peptidil-D-alanil-D-alanin yapısındaki beta-laktam molekülleri ile etkileşirler ve bunun sonucu beta-laktam halkası parçalanır. Beta-laktamazların beta-laktam moleküllerine afinitesi ve reaksiyon hızları dirençte belirleyici olurken, PBP ile beta-laktam ajan arasındaki etkileşim ve afinite ise suşun duyarlılığını belirler (Rice et al., 2003).

PBP değişimine bağlı direnç; düşük afiniteli PBP’in kazanılması, duyarlı olanlarla daha dirençli PBP’in rekombinasyonu, PBP’in aşırı üretimi, nokta mutasyonları ile daha düşük afiniteli PBP’in oluşumu gibi çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır (Eraç, 2006).

### 2.2.6.2. Antibiyotiklerin Hücre İçine Girişinin Kısıtlanması ve Aktif Pompa Sistemleri

Birçok beta-laktam antibiyotik, gram-negatif bakterilerin içerisine dış membran proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçmektedir. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin çeşitli özellikleri (elektriksel yük, çözünürlük, moleküler büyüklük vb), beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Özellikle *P. aeruginosa*’da geçirgenliğin azalmasının yanı sıra aktif pompa sistemleri de antibiyotik direncinde etkilidir (Gür, 2004). Son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak önem kazanan *Pseudomonas*, *E.coli* ve *Acinetobacter* suşlarında çoklu antibiyotik direncinden sorumlu olan aktif pompalar antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlar gibi yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz bileşikler de tanıyarak hücreden atabilen membran transport proteinleridir. Bunlardan bazıları sitoplazmik membranda yerleşmiş tek bileşenli taşıyıcılardır ve substratlarını membranda yakalayarak dışarı atmaktadırlar (Gür, 2004).

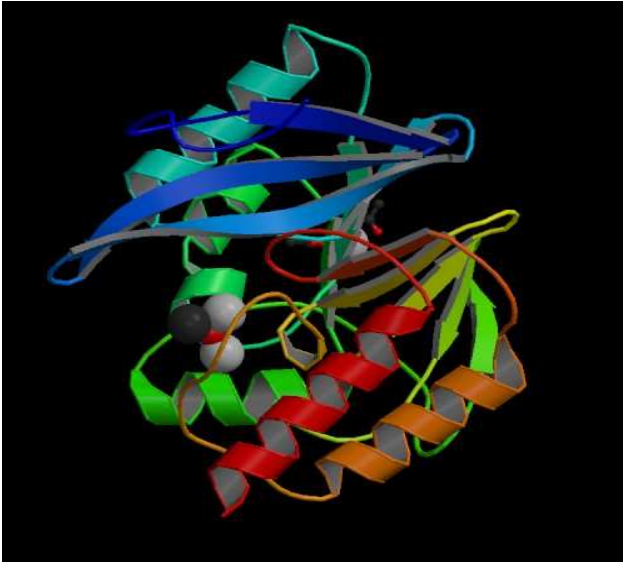
### 2.2.6.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile Antibiyotiklerin İnaktivasyonu

Bu mekanizma beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde gram-negatif bakteriler tarafından sık olarak kullanılmaktadır. Beta laktamaz enzimleri sabit bir düzeyde üretilebildikleri gibi indüklenebilir özellikte de olabilirler. Gram-negatif

basillerde genellikle periplazmik aralığa, gram-pozitiflerde ise dış ortama salgılanırlar (Rice et al., 2003).

### 2.3. Beta-Laktamazlar

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağına parçalama özellikleriyle beta-laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir (Rice et al., 2003). Bu enzimlerin yapısı Şekil 2.3’de gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Beta laktamaz enzimlerinin yapısı

(<http://www.biomarker.cdc.go.kr> )

Beta laktamazlar, heterojen bir grup protein olmalarının yanı sıra bazı yapısal benzerlikler taşırlar ve sınıflandırılmalarında genellikle iki yöntem ön plana çıkmaktadır. Ambler sınıflamasında; amino asit dizilerinin benzerliğine göre A, C ve D sınıfları serin beta-laktamazlardan oluşurken, B sınıfı ise aktivite için çinko iyonuna gereksinim duyan metallo beta-laktamazlardan oluşur (Livermore, 1995). Enzimlerin substrat ve inhibitör profilleri gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri dikkate alınarak yapılan Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması 4 ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşmaktadır (Bush et al., 1995). Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar, Tablo 2.4’de özetlenmiştir.

**Tablo 2.4.** Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar

| Fonksiyonel Grup | Moleküler Sınıf | Öncelikli Substrat  | Örnek Enzimler  |
|------------------|-----------------|---|---|
| 1                | C               | Sefalosporinler   | Kromozomal ve plazmit kökenli AmpC tipi enzimler  |
| 2a               | A               | Penisilinler  | Gram pozitif bakterilerin penisilinazları   |
| 2b               | A               | Penisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler                    | TEM-1, TEM-2, SHV-1   |
| 2be              | A               | Penisilinler, sefamisinler hariç sefalosporinler, monobaktamlar | TEM ve SHV türevi GSBL'ler ve PER-1-2, VEB-1-3, CTX-M-1-50, BGES-1-9 enzimleri                        |
| 2br              | A               | Penisilinler  | IRT-1-28, SHV-10 ve 26, TRC-1   |
| 2c               | A               | Penisilinler, karbenisilin                                      | PSE-1, PSE-3-4, SAR-1   |
| 2d               | D               | Oksasilin, penisilinler   | OXA tipi enzimler (OXA-1-82)  |
| 2e               | A               | Sefalosporinler   | <i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir beta laktamazi   |
| 2f               | A               | Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar     | <i>Enterobacter cloacae</i> 'nın NMC-A ve IMI-1'i ve <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1-2 enzimleri |
| 3                | B               | Karbapenemler dahil birçok beta laktam (monobaktamlar hariç)    | Değişik türlerce üretilen IMP-1-21, VIM-1-12  |
| 4                | ?               | Penisilinler  | <i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı   |

### 2.3.1. A-Sınıfı Beta-Laktamazlar

Aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunan, birçoğu klavulanik asit ile inhibe olan ve genelde plazmit gibi hareketli genetik elementlerle kodlanan enzimlerdir (Rice et al., 2003). *Enterobacteriaceae* üyelerinde en sık rastlanan A sınıfı beta-laktamazlar, TEM-1 ile SHV-1'dir. Bu enzimler, temel olarak penisilinaz aktivitesine sahiptirler, sefalosporinlere karşı etkinlikleri çok azdır ve günümüzde birçok hastanede yaygın olarak rastlanan GSBL'lerin kökenleridir. GSBL'ler birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanı sıra oksiminio sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz eden, klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlardır. TEM ve SHV türevi olmayan birçok A sınıfı beta-laktamaz da bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER grubu (PER-1 ve PER-2) enzimlerdir. Birçok TEM ve SHV türevi GSBL' nin aksine CTX-M grubu, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidimden daha



iyi hidrolize eder ve ayrıca tazobaktam varlığında klavulanik asit ile olduğundan daha kolay inhibe olurlar (Bradford, 2001).

### 2.3.2. B Sınıfı Beta-Laktamazlar

Aktif bölgelerinde “serin” bulunan sınıf A, C ve D’den farklı olarak B sınıfı beta-laktamazlar metallo enzimlerdir ve aktiviteleri için çinko veya diğer ağır metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta-laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok sefalosporine direnç geliştirirler. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmezler (Nordamn ve Poirel, 2002).

### 2.3.3. C Sınıfı Beta-Laktamazlar

C sınıfı beta-laktamazlar, kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* spp. haricinde tüm gram-negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır (Gülay, 2004). C sınıfı beta-laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri, penisilinlere oranla daha iyi hidroliz ederler ancak birçok C sınıfı enzim, beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez.

AmpC tipi beta-laktamaz genlerinin konjugatif plazmitler üzerinde de bulunabildiği gösterilmiştir. Plazmit kaynaklı C sınıfı enzim varlığı; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* ve *M. morgani* gibi birçok gram-negatif türde bildirilmiştir (Rice et al., 2003).

### 2.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar

D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup oksasilini hızla hidrolize edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidrolize edebilen (OXA) beta-laktamazlara daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P. aeruginosa*’da rastlanmaktadır. OXA enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnç oluşturur, klavulanik asit ile çok az inhibe olurlar. Plazmit veya integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaları bakteriler arasında aktarıma katkıda bulunur (Rice et al.,

2003). Bazı OXA tipi enzimler ( OXA-2, OXA-10-11, OXA-14-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35) GSBL karakterindedir (Brown et al., 2005).

#### 2.4. OXA Enzimleri

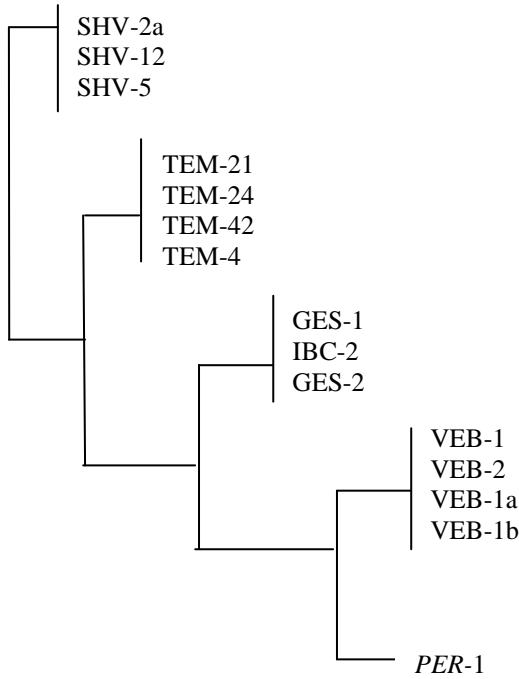
OXA grubu enzimler, TEM ve SHV türevlerinde olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oluşan oksimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimlerdir. OXA beta-laktamaz ailesi genotipik özellikleri ortak olmasından çok fenotipik özellikleri birbirine benzeyen beta-laktamazlar tarafından oluşturulmuş bir gruptur. TEM ve SHV enzimlerinden farklı olarak Sınıf D'ye aittirler. OXA enzimleri için oksasilin ve kloksasilin temel substratlardır. Ayrıca sefalotin gibi dar spektrumlu sefalosporinleri ve ampisilini de hidroliz edebilirler (Gür, 1997; Bradford, 2001). OXA tipi GSBL'ler özellikle *P. aeruginosa*'da bulunur. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde yatan hastalardan izole edilen farklı *Pseudomonas* suşlarında geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki olan OXA-11 ile OXA-14, OXA-15, OXA-16 ve OXA-17 olan beta-laktamazlar tanımlanmıştır. OXA-15 enzimi OXA-2'den diğerleri ise OXA-10'dan köken almıştır. OXA-10'dan kaynaklanan GSBL varyantlarında 73. pozisyondaki serinin asparajin ya da 157. pozisyondaki glisin aspartat ile yer değişimi söz konusudur. OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine neden olurken OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır. Bu enzim genlerinin çoğu plazmit, transpozon veya integron kontrolindedir. OXA-18 doğrudan diğer OXA enzimlerinden oluşmamıştır, en yakın olduğu enzim %42 oranında homoloji gösteren OXA-12'dir. OXA-31 ise sefepime direnç oluşturup seftazidimi etkilememesi ile diğer enzimlerden farklı bir özellik taşımaktadır (Danel et al., 1999; Bou et al., 2000).

#### 2.5. PER-1 Enzimi

PER-1 enzimi, Sınıf A'da yer alan, izoelektrik noktası (pI) 5.3 ve büyüklüğü yaklaşık 30 kD olan, TEM veya SHV türevi olmayan bir GSBL'dir (Nordmann VE Naas, 1994; Luzzaro et al., 2001). *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* başta olmak üzere *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes faecalis* gibi farklı gram-negatif bakterilerde bulunabilir (Vahaboğlu ve ark., 1995; 1997; Pereria et al., 2000). Seftazidim, seftoksime, sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonam

gibi birçok beta-laktam ajana karşı direnç geliştirir. Ancak birçok GSBL gibi karbapenem ve sefamisinlere karşı etkisizdir ve klavulanik asit ile inhibe olur (Nordmann et al., 1993). İncelenen çeşitli suşlarda, *PER-1* enzimini kodlayan genin plazmit veya kromozom üzerinde bulunduğu, bazı suşlarda da transpozon ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Danel et al., 1995; Pagani et al., 2004; Poirel et al., 2005).

*PER-1* enzimi; TEM-SHV grubu GSBL'ler ile %27, D sınıfı beta-laktamazlar ile %17, C sınıfı beta-laktamazlar ile %20 ve *Bacteroides vulgarius*'un CFX A enzimi ile %40 oranında amino asit benzerliği gösterir. Bazı A sınıfı beta-laktamazlar ile *PER-1*'in evrimsel yakınlığı Şekil 2.4'de gösterilmektedir. *PER-1* geninin G+C oranı, 5' - ucu dizisi ve kodon özelliği, bu genin *Pseudomonas* kaynaklı olmadığını düşündürmektedir (Nordmann ve Naas, 1994). X ışınlarıyla incelenen üç boyutlu kristal yapısı, *PER-1*'de A sınıfı enzimlerinin çoğunda ortak olan,  $\Omega$  halkasının katlanma şeklinin ve 166-167. konumlar arasındaki peptid bağının farklı konformasyonda olduğunu ortaya çıkarmıştır (Eraç, 2006).



**Şekil 2.4.** A sınıfı beta-laktamazlar ile *PER-1* enziminin evrimsel yakınlığı (Eraç, 2006)

*PER-1* enzimi ilk kez 1991 yılında Paris’te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış, 1993 yılında ise Nordmann ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. 1991-1993 yılları arasında da seftazidim dirençli 14 adet *P. aeruginosa* suşunda belirlenmiştir. *PER-1*’in 154 kb’den daha büyük bir plazmit tarafından kodlandığı ve suşların çoğunun direnci aktarabildiği bildirilmiştir (Nordmann et al., 1993; Danel et al., 1995).

Ülkemizde iki merkezde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Salmonella typhimurium* izolatlarında *PER-1* enzimi bulunduğu ve 81 MDa’luk plazmitlerce aktarılabildiği belirtilmiştir (Vahaboğlu ve ark., 1995).

İtalya’da Kasım-1998 ile Ağustos-1999 yılları arasında görülen, *PER-1* sentezleyen *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu bir salgın rapor edilmiştir. Bu suşların geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonam, amikasin ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin yanı sıra çeşitli dezenfektanlara da dirençli olduğu ve izole edildikleri hastaların Türkiye ile ilişkili olmadıkları belirlenmiştir (Luzzaro et al., 2001). Aynı tarihlerde Belçika’da da *PER-1* üreten *P. aeruginosa*’lara bağlı ve yine Türkiye ile ilişkili olmayan bir salgın bildirilmiştir. *PER-1* enziminin *P. aeruginosa* dışında, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis* ve *Providencia rettgeri* gibi farklı gram-negatif bakterilerde de görülmesi, *PER-1* sentezleyen suşlarla gelişen infeksiyonların önemini artırmaktadır (Docquier et al., 2001; Pagani et al., 2002; Bahar ve ark., 2004).

## **2.6. Hastane İnfeksiyonları ve Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Metodlarının Önemi**

Yataklı tedavi kurumlarında sağlık hizmetleri ile ilgili olarak gelişen, yatan hasta, sağlık personeli veya ziyaretçilerde oluşan tüm infeksiyonlardır. Center for Disease Control (CDC) kriterlerine göre; hastane infeksiyonu “Hastaneye yatıştan 48-72 saat, taburcu olduktan sonra 10 günlük dönem içinde görülen infeksiyonlardır” şeklinde tanımlanmıştır. Hastane infeksiyonları arasında üriner sistem infeksiyonları %20-40 oranla ilk sırada yer alırken, cerrahi yara infeksiyonları % 20 ile ikinci sırada, alt solunum yolu infeksiyonları ise %17 ile üçüncü sırada bulunmaktadır. Hastane

infeksiyonu etkenleri arasında yer alan *P. aeruginosa*, hastane infeksiyonu etkeni Gram-negatif çomaklar arasında % 6-12'lik bir orana sahiptir. Hastane infeksiyonları hastanede yatışı 3-7 gün, hasta başına maliyet ve mortaliteyi ise ortalama iki kat artırır. Tüm bu sorunlar göz önüne alınarak erken klinik ve laboratuvar tanı, kolonizasyon ve etken ayırımı ile moleküler teknikler kullanılarak salgınların kökenini araştırmak oldukça önem taşımaktadır (Horan et al.,1992; Garner et al., 1998; Bergogne, 1999; McGowan, 2001).

Moleküler mikrobiyolojik yöntemler hastane infeksiyonlarına neden olan etkenlerin bulaşma yollarını, mekanizmalarını açığa çıkarmada çok önemli katkı sağlar. Klonal yakınlığın (aynı biyotip, benzer genotip, ortak virülans faktörlerine sahip aynı türün üyeleri) varlığı veya yokluğunu belirleyen moleküler teknikler genetik olarak ilişkili patojenlerle oluşan infeksiyonların yayılımını takip etmede çok etkilidir (Tenover et al., 1997; Pfaller ve Herwaldt, 1997; Wilson ve Spencer, 1999; D'Agata et al., 2000; de Man et al., 2001; Streulens, 2002; Stratton ve Grene, 2004; Andrei ve Zervos, 2006).

Hastane infeksiyonları epidemiyolojisi ve kontrolünde klasik mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmeler büyük katkılar sağlamaktadır. Moleküler yöntemler klasik yöntemlerin sağladığı katkıların yanısıra, infeksiyonların hızlı tanısı ve özellikle üretimi zor etkenlerin kültürü, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanması, antibiyotik direncinin belirlenmesi, izlemi ve hastane infeksiyonları epidemiyolojisi konusunda yeni açılımlar sağlamaktadır (Stratton ve Grene, 2004; Singh et al., 2006; Andrei ve Zervos, 2006).

## **2.7. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri**

Moleküler epidemiyoloji, ilk olarak DNA temelli yöntemlerin uygulanması ile infeksiyon oluşturan izolatların tiplendirilmesinde kullanılmıştır. Günümüzde ise; etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması, tiplendirilmesi, infeksiyon hastalıklarının tanısı ve patogeneze sorumlu genlerin saptanması, genetik duyarlılığın belirlenmesi, konak-patojen ilişkisi, konağın infeksiyonlara duyarlılığından sorumlu faktörlerin incelenmesi, bakteriyel fenotipler içinde doku tropizmi, virülans ve bulaşıcı

olabilme yönünden farklılık gösterebilen spesifik suşların araştırılması, toplumlar ve akraba gruplar arasında hastalığın yayılması, kontrolü ve etiyolojisine moleküler seviyede tanımlanan potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkısı, infeksiyon hastalıklarının aile içi ve toplumlar arasında yayılmasının önlenmesi konularını da içine alan bir bilim dalı haline gelmiştir (Tompkins, 1998; Andrei ve Zervos, 2006; Yamamoto, 2007).

Belirli bir etkene bağlı infeksiyonun prevalansında artış olması, bir hasta grubundan aynı tür bakterinin izole edilmesi, benzer antibiyotik duyarlılık profili veya biyotipe sahip izolatların varlığı epidemiyolojik araştırmaları gündeme getirmektedir (Arbeit, 1995; Tenover et al., 1995).

Moleküler tiplendirme sistemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Genel olarak salgın izolatları klonal olarak ilişkilidir yani ortak kaynaktan köken alırlar. Klonal ilişkili mikroorganizmalar; ortak virülans faktörleri, biyokimyasal özellikleri ve genetik karakterleri paylaşan aynı türün üyesidirler. Bu bilgiler, hastanelerde ve toplum içerisinde hastalığın yayılmasını anlamada ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır (Tompkins, 1998; Pfaller, 2001).

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Bu amaçlar aşağıda özetlenmiştir (Arbeit, 1995; Struelens, 1999).

1. Salgın araştırmalarında, salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi,
2. Hastaların epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi,
3. Reaktivasyonun yeni bulaştan ayırt edilmesi,
4. Hastane infeksiyonları ve toplum kökenli infeksiyonların belirlenmesi,
5. Laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması,
6. Antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tiplendirme (antibiyotik-rezistan genotiplendirme) ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi,
7. İnfekte popülasyondaki epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesine katkıda bulunulması amacıyla kullanılmaktadır

### 2.7.1. Epidemiyolojik Tiplendirmenin Gerekli Olduğu Durumlar

- 1- **Birçok kişinin hasta veya kolonize olduğu ve ortak bir kaynaktan gelen salgınlar:** Genelde ortak kaynaktan gelen salgınlar, tanı ve tedavi amacıyla kullanılan steril olmayan aletlerle (solunum yolu gereçleri, kateterler, endoskoplar) ilişkilidir. Sağlık personellerinin elleriyle ve nadiren direkt temas yoluyla yayılma olmaktadır. Tiplendirme ile salgının özellikleri belirlenerek kimlerin nerede ve ne zaman etkilendiği, bulaş yolları, potansiyel kaynak ve vektörlerin tanımı yapılabilir (Pfaller ve Herwaldt, 1997).
- 2- **Yüksek riskli birimlerdeki hastaların izlenmesi:** Ağır immün yetmezliği olan hastalar sıklıkla özel bakım birimlerinde birlikte yatmaktadırlar. Bunlardan izole edilen bakterilerin tiplendirilmesi ile belli bir tür mikroorganizmanın kolonizasyonunun olup olmadığı anlaşılabilir.
- 3- **Antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumlar:** Uygulanan antibiyotik tedavisine yanıt alınmış gibi görünen bir infeksiyonun, antibiyotik kesildikten sonra yeniden görülmesi durumunda izolatların tiplendirilmesi büyük yarar sağlamaktadır.
- 4- **Relaps ve reinfeksiyon ayırımının yapılması:** Bir hastadaki infeksiyonun farklı epizotlarından izole edilen suşların analizi sonucunda hep aynı tipin saptanması relapsı, farklı tiplerin saptanması ise reinfeksiyonu gösterir. Reinfeksiyon tanımlanması ile hastanın savunma sistemindeki bir eksikliğe bağlı olarak o etkene karşı duyarlı olduğu söylenebilir. Farklı zamanlarda aynı tip mikroorganizmanın izole edilmesi daha önceki infeksiyon odağına veya kalıcı bir kolonizasyona bağlı relapsı düşündürür (Arbeit, 1995).

### 2.7.2. Tiplendirmede Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki birçok suşun birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların saptanması gerekmektedir. “Alt tipleme veya suş klasifikasyonu” olarak ifade edilen bu tiplerede bazı fenotipik ve genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır (Swaminathan ve

Matar, 1993; Köksal, 1999; De La Puente et al., 2000; Masumoto et al., 2000). İnfeksiyon etkenlerini tiplendirme yöntemleri Tablo 2.5’de verilmektedir.

**Tablo 2.5.** İnfeksiyon etkenlerini tiplendirme yöntemleri (Durmaz, 2001)

---

|  |
|--|
| <b>Fenotipik Yöntemler</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiyotik duyarlılık testi</li> <li>• Biyotipleme</li> <li>• Serotipleme</li> <li>• Bakteriyosin tipleme</li> <li>• Bakteriyofaj tiplemesi</li> <li>• Protein analizi</li> </ul>  |
| <b>Genotipik Yöntemler</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plazmid analizi</li> <li>• Ribotipleme</li> <li>• Kromozomal DNA’nın restriksiyon endonükleaz analizi (RFLP, PFGE)</li> <li>• Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler (REP-PZR, AP-PZR)</li> <li>• Sekans analizi</li> <li>• Microarray-DNA chip teknolojisi</li> </ul> |

---

Genotipleme ile tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak salgın esnasında toplanan, epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmakta ve böylece infeksiyonun kaynağı belirlenmektedir. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar farklı, ilişkili suşlar ise aynı genotipik profile sahip olarak değerlendirilir (Tenover et al., 1995).

Tiplendirme yöntemlerinin yaygın kullanım alanı bulabilmesi için tiplendirilebilirlik, ayırım gücü, tekrarlanabilirlik, stabilite, tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolayca yorumlanabilir olması, yöntemin değişik mikroorganizma grubu veya fazla sayıda örneğin analizine uygunluğu gibi belli kriterlerinin olması gerekmektedir (Arbeit, 1995; Struelens, 1999; Olive ve Bean, 1999; Tang et al., 2000).



**Tablo 2.6.** Genotipleme yöntemlerinin karşılaştırılması (Struelens, 1999; Sloos et al., 2000)

|  | <b>PFGE</b> | <b>PZR-RFLP</b> | <b>RAPD</b> | <b>Dizi Analizi</b> |
|--|-------------|-----------------|-------------|---------------------|
| <b>Tiplendirilebilirlik</b>                    | Mükemmel    | Mükemmel        | Mükemmel    | Mükemmel            |
| <b>Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik</b>      | İyi         | İyi             | Orta        | İyi                 |
| <b>Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik</b> | İyi         | İyi             | Kötü        | İyi                 |
| <b>Stabilite</b>                               | İyi         | Mükemmel        | İyi         | İyi                 |
| <b>Ayrım gücü</b>                              | Yüksek      | Orta            | Yüksek      | Yüksek              |
| <b>Uygulama kolaylığı</b>                      | Orta        | Kolay           | Kolay       | Zor                 |
| <b>Yorumlama kolaylığı</b>                     | Kolay       | Kolay           | Kolay       | Orta                |
| <b>Sonuç alma süresi (gün)</b>                 | 3           | 1-2             | 1           | 2                   |
| <b>Yapılandırma maliyeti</b>                   | Orta        | Orta            | Orta        | Yüksek              |
| <b>Test başı maliyet</b>                       | Orta        | Düşük           | Düşük       | Yüksek              |

## 2.8. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE) özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden kesebilen ve genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. Sıklıkla kullanılan RE enzimleri arasında *EcoRI*, *Clal*, *HindIII*, *Hinfi* sayılabilir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine uygulanması sonucunda etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "RFLP" adı verilir (Persing et al., 1993).

RFLP analizi bakteriyel kromozom ve ekstra-kromozomal DNA'nın veya viral genomun (RNA ve DNA) restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır. Bu yöntem DNA'nın izolasyonu, DNA'nın amplifikasyonu (çoğaltılması), DNA'nın RE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesini içeren beş basamakta gerçekleştirilmektedir (Persing et al., 1993).

RFLP yöntemdeki en önemli basamak, DNA'nın hücre dışına çıkarılması ve saflaştırılmasıdır. DNA izolasyonunda gram-negatif bakterilerde önce lizozim, sonra

triton-X 100 gibi iyonik olmayan ya da sodyum dodezil sülfat (SDS) gibi iyonik bir deterjanla başlanabilirken, gram-pozitif bakterilerde lizostafin ya da genel amaçlı litik enzimler tercih edilir (Persing et al., 1993).

RFLP yöntemi kolaylıkla uygulanabilen duyarlı bir yöntemdir ancak enzim seçimi çok önemlidir. Bu yöntemle çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olmayabilir. Az sayıda mikroorganizma ile çalışıldığında değerlendirme nispeten kolayken sayı arttıkça kıyaslama güçleşmektedir. Bu zorlukları aşmak için kıyaslanan bantları azaltmak faydalı olabilir (Persing et al., 1993).

## **2.9. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR)**

RAPD-PZR yönteminde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler, özel bir DNA bölgesine yönelik olmayan genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C bakımından zengindir. Bağlanma ısısı 40-50°C'ye düşürülmüştür ve düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında seçilen primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgül bölgelere hem de özgül olmayan bölgelere rastgele bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından agaroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon (delesyon veya insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır ve oluşan bantlar değerlendirmeye yetecek düzeydedir (Ralp ve McClelland, 1998; Olive ve Bean, 1999).

Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatlar "epidemiyolojik olarak ilişkili" şeklinde yorumlanabilir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplendirme yöntemleriyle çalışılmalıdır (Van Belkum, 1994).

RAPD yönteminin bir başka uygulama şeklinde ökaryot ve prokaryotlarda bulunan DNA içindeki ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) bölgelerine yönelik primerler kullanılmaktadır. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PZR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Eskitürk ve ark., 1997; Van der Zee et al., 1999).

## **2.10. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE)**

Bir kısım fenotipik yöntemler infeksiyonların epidemiyolojilerini tanımlama da kullanışlı olsalar da bunların çoğunun deneysel araştırmalarda kullanılması sorun oluşturmaktadır. Bunların yerini yeni geliştirilen DNA temelli tiplendirme yöntemleri almıştır. Bu yöntemler içerisinde PFGE çok önem taşır ve özellikle salgın araştırmalarında yaygın bir kullanımı vardır (Arbeit, 1995).

PFGE, moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozda süspanse edilip küçük kalıplar içine dökülmektedir. Bakteri hücreleri deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE’ de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA’da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Lizis işlemi takiben agaroz kalıpları birkaç kez yıkanarak veya diyaliz edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra DNA parçaları içeren kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yön değiştiren elektrik akımı verilmektedir. DNA, elektroforez sırasında farklı yönlere doğru hareket edecek olursa bantlar birbirinden ayrılırlar. Jele uygulanan elektrik alanının yön değiştirmesi ile daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı olarak hareket ederler ve böylece büyük DNA parçaları geride kalarak dizilirler. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır. Elektroforez

sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır (Swaminathan ve Matar, 1993). Bilgisayara dayalı analizlerde, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması amacıyla “veri bankası” oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların profillerinin, daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı bulunmaktadır (Olive ve Bean, 1999).

### 2.10.1. Restriksiyon Profillerinin Analizi ve İzolatların Yakınlık Derecelerine Göre Sınıflandırılması

Restriksiyon profili analizi ve yakınlık derecelerinin belirlenmesi amacıyla öncelikli olarak, ortak ya da salgın profili belirlenir. Ortak profil yoksa büyük olasılıkla izolatlar birbirleriyle ilişkisizdir. Ortak suşun profili belirlendikten sonra buradaki bantların sayı ve boyutları diğer izolatları ile karşılaştırılır. Her bir izolatın profili, ortak suşla olan ilişkisine göre sınıflandırılır. Görüntülenen PFGE profillerinin oluşması üzerine etki eden genetik olaylar Tablo 2.7’de özetlenmiştir (Tenover et al., 1995).

**Tablo 2.7.** Genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkisi (Tenover et al., 1995)

---

***Yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşmasıyla sonuçlanan nokta mutasyon:*** Yeni profilde, salgın profilinde bulunan bir bant olmamalı ve salgın profilinde olmayan iki yeni ve daha küçük bant olmalı; iki küçük bantın boyutlarının toplamı yaklaşık olarak büyük bantın boyu kadar olmalıdır. Bu değişim, üç bantı farklı profil ortaya çıkaracaktır.

***Bir restriksiyon bölgesinin kaybıyla sonuçlanan nokta mutasyon:*** Yeni profil, salgın suşunda olmayan daha büyük bir bant kazanırken iki küçük bantı kaybetmiş olacaktır. Bu değişim de üç bantı farklı profil olarak gözlenecektir.

***Restriksiyon parçası içine restriksiyon bölgesi bulunmayan yeni bir DNA insersiyonu:*** Yeni profil, salgın profiliyle aynı sayıda banta sahip olacaktır ancak, büyüklüğü farklı (daha büyük) yeni bir bant oluşacaktır.

***Bir banttan içinde restriksiyon bölgesi bulunmayan parçanın delesyonu:*** Yeni profil, büyük bir parçası eksik durumdadır buna karşılık, küçük boyutta yeni bir banda sahip olacaktır. Bu değişim iki bant farklı profil olarak görülecektir.

---

Tenover ve ark. (1995); PFGE sonuçlarının yorumlanması için belirli bir sistem önermişlerdir. Bu sistemde bant profillerine bakılarak izolatların birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapılabilmektedir.

### 2.10.2. PFGE Profillerinin Yorumlanması

PFGE profillerinin yorumlanması kriterleri için yapılan öneriler, tiplendirme çalışmalarında sınırlı zamanı ve kaynağı olan, tek bir restriksiyon endonükleaz kullanarak suşları analiz edecek laboratuvarlar için düzenlenmiştir ve Tablo 2.8'de özetlenmiştir (Tenover et al., 1995).

**a. Aynı izolatlar:** Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik açıdan farksız olarak kabul edilirler. Salgın suşu ile aynı profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Epidemiyolojik verilerle desteklenen tek bant farklılığının da klonal ilişkiyi gösterdiği kabul edilmektedir.

**b. Yakın ilişkili izolatlar:** Salgın suşu ile aralarında iki-üç bant farkı olan izolatlar için kullanılır. İzolat salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik açıdan salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir.

**c. Muhtemel ilişkili izolatlar:** Salgın suşu ile aralarında dört-altı bant farkı olan izolatlar için kullanılır. Bu değişim, iki bağımsız genetik değişikliğin (insersiyon/delesyon ya da restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Epidemiyolojik yönden bu izolat, salgın suşuyla olası ilişkili olarak değerlendirilir. Bu izolatlar salgın suşuyla aynı genetik soydan gelebilirler, ancak genetik olarak ilişkili değildirler, epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri ise daha azdır.

**d. İlişkisiz izolatlar:** Bu izolatlarda, salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak salgın suşuyla ilişkisiz oldukları kabul edilir (Smith et al., 2000).

**Tablo 2.8.** PFGE profillerinin yorumlama kriterleri (Durmaz, 2001)

| <b>Kategori</b>       | <b>Salgın suşuna kıyasla genetik farklılık sayısı</b> | <b>Salgın suşundan farklılık gösteren bant sayısı</b> | <b>Epidemiyolojik yorum</b>     |
|-----------------------|---|---|---------------------------------|
| <b>Aynı</b>           | 0   | 0   | İzolat, salgının bir parçası    |
| <b>Yakın ilişkili</b> | 1   | 2-3/ 1-3  | İzolat, salgınla yakın ilişkili |
| <b>Olası ilişkili</b> | 2   | 4-6   | İzolat, salgınla olası ilişkili |
| <b>Farklı</b>         | $\geq 3$  | $\geq 7$  | İzolat, salgınla ilişkisiz      |

Bu kriterler kullanılırken dikkate alınması gereken belirli hususlar vardır:

1. PFGE ile en az 10 ayrı bant oluşmuşsa bu kriterler güvenle kullanılabilir. Daha az sayıda bant tespit edildiğinde kriterlerin güvenilirliği ve ayırt etmedeki yeterliliği belirsizdir.

2. Kriterler, genetik değişimin sınırlı olduğu düşünülen küçük ve lokal çalışmalar için belirlenmiştir. Hastanelerde ya da toplumda görülen salgınlarla ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar sırasında kısa bir zaman sürecinde (1-3 ay) alınmış izolatlar için kullanılabilir.

Bu öneriler, tiplendirme çalışmalarında sınırlı zamanı ve kaynağı olan, tek bir restriksiyon endonükleaz kullanılarak suşları analiz edecek laboratuvarlar için düzenlenmiştir (Tenover et al., 1995).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Aletler

Spektrofotometre (WPA UV 1101)

Manyetik karıştırıcı (MSH Basic Yellow<sup>line</sup>)

Vorteks (VV3 VWR)

Görüntüleme cihazı (Gel/ChemiDoc XRS Biorad)

CHEF-Mapper pulsed field electrophoresis system (Biorad)

Thermal cyclers (MBS Satellite Thermo)

Çalkalamalı sıcak su banyosu (ST 402 Nüve)

Yatay elektroforez sistemi (Sub-Cell Model 96 Biorad)

Güç kaynağı (Power Pac Basic Biorad)

pH metre (pH 211 Hanna)

Kuru ısı bloğu (TDB-120 Thermo)

Masaüstü santrifüj (Kubota 3500)

Hassas terazi (Vibra)

Laminar akımlı kabin (Heraeus)

Mikropipet (0.5-10 µl) (Socorex)

Mikropipet (10-1000 µl) (Hamilton)

Mikrosantrifüj tüpleri (0.2, 0.5, 1.5, 2 ml) (CLP)

Otomatize bakteriyel tanımlama ve duyarlılık sistemi VITEK 2 (bioMerieux)

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

Boric acid (Merck)

Ethylene diamine tetra acetic acid EDTA (Sigma)

Ethidium bromide (Sigma)

N-Lauroyl sarcosine sodium salt (Sigma-Aldrich)

Pulsed field agaroz (Biorad)

Agaroz (Biorad)

Sodium dodecyl sulphate (Merck)

Tris-hydrochloride (Appllichem)

Trisma base (Sigma)  
Thiourea (Merck)  
DNA Ladder (100 bp) (Fermentas)  
6X Loading dye solution (Fermentas)  
dNTP Mix (Fermentas)  
Lysozyme (Sigma)  
Proteinase K (Sigma)  
Taq DNA polymerase (Fermentas)  
DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen)  
PER-A primeri (Tıb Molbiol)  
PER-D primeri (Tıb Molbiol)  
OPR-1 primeri (Tıb Molbiol)  
OPR-2 primeri (Tıb Molbiol)  
ERIC-2 primeri (Tıb Molbiol)  
*PvuII* ve *StuI* restriksiyon enzimleri (Fermentas)  
*HaeIII* restriksiyon enzimi (Fermentas)  
*SpeI* restriksiyon enzimi (Fermentas)  
API ID32 GN stripleri (bioMerieux)  
Mueller-Hinton broth (Becton Dickinson)  
Mueller-Hinton agar (Merck)  
Tryptic Soy agar (Fluka Biochemika)  
Kanlı ve EMB Agar (Salubris)

Antimikrobiyal ajan içeren diskler (Oxoid):

Seftazidim (30 µg)  
Piperasilin (100 µg)  
Aztreonam (30 µg)  
Sefotaksim (30 µg)  
Sefepim (30 µg)  
İmipenem  
Meropenem (10 µg)  
Amoksisilin-klavulanik asit (30 µg)  
Piperasilin-Tazobaktam (100-10 µg)



### 3.1.3. Tamponlar

**1X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı:** 44.5 mM tris, 44.5 mM borik asit, 1 mM EDTA 1 litre distile suda çözülerek pH:8.4 olacak şekilde hazırlandı.

**Hücre Süspansiyon Tamponu (HST):** 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA ile hazırlandı ve pH:8.0 olarak ayarlandı.

**Hücre Liziz Solüsyonu I:** 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA ile hazırlanarak pH 8.0'e ayarlandı. Kullanım sırasında 2.5 mg/ml lizozim ve 1.5 mg/ml proteinaz K eklendi.

**Hücre Liziz Solüsyonu II:** 0.5 M EDTA, %1 sarkozil ile hazırlanan solüsyona uygulama aşamasında 400 µg/ml proteinaz K ilave edildi.

**Tris-EDTA (TE) Tamponu:** 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA kullanıldı ve pH 7.6 olarak hazırlandı.

### 3.1.4. Besiyerleri

**Mueller-Hinton Broth:** 22 gr toz halde besiyeri tartılarak 1 lt distile su içerisinde çözüldükten sonra, otoklavda steril edilerek kullanıldı.

**Mueller-Hinton Agar (MHA):** 1 lt besiyeri için 34 gr toz MHA besiyeri tartılıp distile su içerisinde çözülerek steril edildi.

**Triptik Soy Agar:** 40 gr besiyeri 1 lt distile su ile karıştırılarak otoklavda steril edildi ve petrilere eşit hacimde dağıtıldı.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Tiplendirilmesi

Ocak 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli klinik ve polikliniklerinden, OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji SDL'ye gelen örneklerden izole edilerek, VITEK2 otomatize bakteriyel tanımlama ve duyarlılık testi sistemi ile tanımlanmış ve duyarlılık testleri yapılmış olan, CDC kriterlerine göre hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen ve seftazidime dirençli 50 adet *Pseudomonas aeruginosa* suşu seçildi. "Eosine-Methylen Blue" (EMB) agarda üreyen laktoz negatif kolonilerin hareket, oksidaz aktivitesi, koloni morfolojisi, pigment oluşturma, kanlı agarda hemoliz oluşturma özellikleri gibi konvansiyonel yöntemlerle, ayrıca API ID32 GN stripleri ile de tanımlamaları doğrulanan tüm suşlar *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlandı.

### 3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

*Pseudomonas aeruginosa* suşlarının seftazidim, piperasilin, aztreonam, sefotaksim, sefepim, imipenem ve meropenem duyarlılıkları, "Clinical and Laboratory Standarts Institute" (CLSI) önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı (CLSI, 2006). Bu amaçla incelenecek suşların süspansiyonları, 18-24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerinden inokulum yoğunluğu 0.5 McFarland ( $1-2 \times 10^8$  cfu/ml) standardına uygun olacak şekilde hazırlanarak, steril bir eküvyonla Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerinin tüm yüzeyine homojen bir şekilde inoküle edildi. Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Besiyeri üzerine seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefepim (30 µg), piperasilin (100 µg), piperasilin-tazobaktam (100-10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) antimikrobiyal ilaç diskleri merkezleri arasındaki ve petrinin kenarına olan uzaklıkları 25 mm olacak şekilde yerleştirildi. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI sınır değerlerine göre yorumlandı.

### 3.2.3. Çift Disk Sinerji Testiyle GSBL Saptanması

GSBL varlığını belirlemek için seftazidime dirençli 50 adet *P. aeruginosa* suşunda çift disk sinerji yöntemi kullanıldı. MHA besiyeri yüzeyine 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Tarama testi için plakların merkezine amoksisilin-klavulanik asit (20 µg + 10 µg) diski ve çevresine merkezleri arasındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde aztreonam, seftazidim, sefepim ve piperasilin diskleri yerleştirildi. Amoksisilin- klavulanik asit diskine doğru beta-laktam inhibisyon zon çapının genişlemesi, GSBL pozitifliği olarak kabul edildi.

### 3.2.4. *PER-1* ve *OXA-10* Grubu Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemiyle Araştırılması

*P. aeruginosa* bakteri hücrelerinden elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *PER-1* ve *OXA-10* gen bölgeleri amplifiye edildi.

#### 3.2.4.1. *Pseudomonas aeruginosa* Bakteri Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırması

*P. aeruginosa* bakteri hücrelerinden DNA eldesi için Qiagen DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon üretici firmanın belirttiği yönteme göre yapıldı.

- Mueller-Hinton agar üzerinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak 180 µl ATL süspansiyon tamponu içerisinde karıştırıldı ve 30 saniye vortekslenen bakteri süspansiyonu homojen hale getirildi.
- 20 µl Proteinaz K ilave edilen süspansiyon 15 saniye vortekslendikten sonra 56°C' de kuru blok ısıtıcıda 1-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon esnasında 30 dakika aralıklarla tüpler vortekslendi.
- 200 µl AL lizis solüsyonu eklenerek 15 saniye vortekslendi.
- 70°C' de 10 dakika kuru blok ısıtıcıda inkübasyondan sonra 200 µl %100'lük etanol ilave edilerek 15 saniye vortekslendi.

- Süspansiyon spin kolona alındı ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- Spin kolon üzerine 500 µl AW1 yıkama solüsyonu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edildi.
- 500 µl AW2 yıkama solüsyonu ilave edildikten sonra 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak tekrar 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
- Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpe alınarak üzerine 200 µl AE elüsyon tamponu eklendi. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Mikrosantrifüj tüpte toplanan sıvı kalıp DNA olarak kullanılmak üzere -20°C' de saklandı.

#### **3.2.4.2. PZR Optimizasyonu**

PZR çalışmalarında kullanılacak magnezyum miktarı ve primer bağlanma ısılarının tespiti için farklı PZR optimizasyon denemeleri yapıldı.

##### **a. Magnezyum Klorür Optimizasyonu**

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda magnezyum klorür kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması Tablo 3.1'de özetlenmiştir.



### 3.2.4.3. PZR Yöntemiyle *PER-1* Geninin Amplifikasyonu

*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında seftazidim direncine sebep olan *PER-1* geninin belirlenmesi için *PER-A* ve *PER-D* primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulamada kullanılan PZR reaksiyon karışım içeriği Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** *PER-1* gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli 50 µl PZR reaksiyon karışımı

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 10X PZR tamponu         | 1X     |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2.5 mM |
| 10 mM dNTP karışımı     | 2 mM   |
| Taq DNA polimeraz       | 5 U    |
| <i>PER-A</i> primeri    | 2.5 µM |
| <i>PER-D</i> primeri    | 2.5 µM |
| Kalıp DNA               | 2 µl   |
| Saf su                  | 23 µl  |

### 3.2.4.4. PZR Yöntemiyle *OXA-10* Geninin Amplifikasyonu

*OXA-10* geninin varlığını saptamak için, uygulanan amplifikasyon işleminde *OPR-1* ve *OPR-2* primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği Tablo 3.4'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.4.** *OXA-10* gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli 50 µl reaksiyon karışımı

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 10X PZR tamponu         | 1X     |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2.5 mM |
| 10 mM dNTP karışımı     | 2 mM   |
| Taq DNA polimeraz       | 5 U    |
| <i>OPR-1</i> primeri    | 2.5 µM |
| <i>OPR-2</i> primeri    | 2.5 µM |
| Kalıp DNA               | 2 µl   |
| Saf su                  | 23 µl  |

### 3.2.4.5. *PER-1* ve *OXA-10* Grubu Gen Bölgeleri için Amplifikasyon Programı

|  |            |
|--|------------|
| 94°C' de 5 dakika ön denatürasyon          | } 35 döngü |
| 95°C' de 45 saniye hedef DNA denatürasyonu |            |
| 56°C' de 45 saniye primer bağlanması       |            |
| 72°C' de 1 dakika primer uzaması           |            |
| 72°C' de 7 dakika son uzama                |            |

### 3.2.4.6. DNA Elektroforezi

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için agaroz konsantrasyonu % 2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kalıbına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. 2 saat süresince 110 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 5 µg/ml etidyum bromid içeren solüsyonda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemini takiben örnekler ait DNA bantları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırmalı olarak görüntüleme cihazında incelendi.

### 3.2.5. Seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *PER-1* ve *OXA-10* geni taşıdığı saptanan suşların seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri, CLSI önerileri doğrultusunda, Mueller-Hinton Broth besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak saptandı (CLSI, 2006). Üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

### 3.2.6. İzolatların Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Yöntemiyle Klonal Yakınlıklarının Araştırılması

“Enterobacterial repetitive intergenic consensus” (ERIC) dizgilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PZR yöntemiyle izolatlar arasındaki klonal ilişki araştırıldı (Versalovic et al., 1991).

#### a. Reaksiyon karışımı (50 µl):

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 10X PZR tamponu         | 1X      |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2.5 mM  |
| 10 mM dNTP karışımı     | 200 µM  |
| Taq DNA polimeraz       | 2.5 U   |
| ERIC-2 primeri          | 25 pmol |
| DNA ekstraktı           | 5 µl    |
| Steril deiyonize su     | 32.5 µl |

#### b. RAPD-PZR amplifikasyon programı:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| 95°C' de 1 dakika | } 30 döngü |
| 94°C' de 1 dakika |            |
| 40°C' de 1 dakika |            |
| 72°C' de 1 dakika |            |
| 72°C' de 5 dakika |            |

#### c. Elektroforez:

Amplifikasyon ürünü (10 µl) ile 2 µl 6X yükleme solüsyonu karıştırılarak 1X TBE tamponu içerisinde bulunan % 1.5' luk agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi. 120 volt'ta 90 dakika süreyle DNA bantları yürütüldü. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus kullanılarak belirlendi. RAPD yöntemiyle klonal yakınlıkları saptanan izolatların dendogramları Quantitiy One&Software yazılım sisteminde “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” yöntemi kullanılarak oluşturuldu.



**Tablo 3.5.** Çalışmada kullanılan primer/oligonükleotid dizileri (Aktaş ve ark., 2005)

| Primer/Oligonükleotid Adı      | Primer/Oligonükleotid Dizisi            |
|--------------------------------|---|
| <b>PER-1'e özgü primerler</b>  |   |
| PER-A                          | 5' - ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC - 3'    |
| PER-D                          | 5' - AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA - 3'    |
| <b>OXA-10'a özgü primerler</b> |   |
| OPR-1                          | 5' - GTC TTT CGA GTA CGG CAT TA - 3'    |
| OPR-2                          | 5' - ATT TTC TTA GCG GCA ACT TAC - 3'   |
| ERIC-2 Primeri                 | 5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3' |

### 3.2.7. *PER-1* ve *OXA-10* Gen Bölgelerinin Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

RFLP analizi ile *PER-1* ve *OXA-10* gen bölgelerinin restriksiyon profilleri belirlendi (Vahaboğlu ve ark., 1998).

#### 3.2.7.1. *PER-1* ve *PER-2* Gen Bölgelerinin RFLP ile Belirlenmesi

*PER* gen bölgesi içerdiği saptanan suşların, *PER* PZR ampliconlarının *PvuII* ve *StuI* enzimleri kullanılarak restriksiyon analizleri yapıldı. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin özellikleri Tablo 3.6'da belirtilmiştir.

#### ***PvuII* enzim kesimi için RFLP reaksiyon karışımı;**

- 10 µl PZR ürünü
- 2 µl (1X) G tamponu
- 1 µl *PvuII* enzimi
- 7 µl saf su

#### ***StuI* enzim kesimi için RFLP reaksiyon karışımı;**

- 10 µl PZR ürünü
- 2 µl (1X) B tamponu
- 1 µl *StuI* enzim
- 7 µl saf su

Hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C'de 1-16 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 20 µl reaksiyon karışımına 4 µl yükleme solusyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Kesilmiş *PER-1* DNA'sı, 1X TBE tamponu ile hazırlanmış olan %3'lük agaroz jelde 120 V akımda 180 dakika olacak şekilde yürütüldü. 5 µg/ml etidyum bromit ile boyanan jelde oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında Gene Ruler 100 bp DNA Ladder ile karşılaştırılarak saptandı.

### **3.2.7.2. OXA-10 PZR Gen Bölgelerinin RFLP ile Tiplerinin Belirlenmesi**

*OXA-10* ailesine ait *OXA-11*, *OXA-14*, *OXA-16* tiplerini belirlemek için RFLP yöntemiyle *PvuII* ve *HaeIII* enzimleri kullanılarak *OXA-10* PZR ürünlerinin restriksiyon analizleri yapıldı (Vahaboğlu ve ark., 1998).

#### ***PvuII* enzim kesimi için 20 µl RFLP reaksiyon karışımı;**

- 10 µl PZR ürünü
- 2 µl (1X) G tamponu
- 1 µl *PvuII* enzimi
- 7 µl saf su

#### ***HaeIII* enzim kesimi için 20 µl RFLP reaksiyon karışımı;**

- 10 µl PZR ürünü
- 2 µl (1X) R tamponu
- 1 µl *HaeIII* enzimi
- 7 µl saf su

Çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 1-16 saat inkübe edilen reaksiyon karışımına 4 µl yükleme solusyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Kesilmiş *OXA-10* DNA'sı, %3'lük agaroz jelde 120 V akımda 180 dakika olacak şekilde yürütüldü. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri Görüntüleme cihazında Gene Ruler 100 bp DNA Ladder ile karşılaştırılarak belirlendi.

**Tablo 3.6.** Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin özellikleri

| Restriksiyon enzimleri | Enzim kesim noktası  | (%100) Enzim aktivitesi için önerilen tampon | İnkübasyon sıcaklığı | İnkübasyon sıcaklığı |
|------------------------|--|--|----------------------|----------------------|
| <i>Pvu-II</i>          | 5' -C A G <sup>^</sup> C T G- 3'<br>3' -G T C <sup>^</sup> G A C- 5' | (1X) G tamponu                               | 37°C                 | 1-16 saat            |
| <i>Stu-I</i>           | 5' -A G G <sup>^</sup> C C T- 3'<br>3' -T C C <sup>^</sup> G G A- 5' | (1X) B tamponu                               | 37°C                 | 1-16 saat            |
| <i>HaeIII</i>          | 5' -G G <sup>^</sup> C C- 3'<br>3' -C C <sup>^</sup> G G- 5'         | (1X) R tamponu                               | 37°C                 | 1-16 saat            |

### 3.2.8. İzolatların Pulsed-Field Jel Elektrophoresis (PFGE) Yöntemi ile Epidemiyolojik Analizi

Moleküler tiplendirmede kullanılan PFGE yönteminin aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

#### 3.2.8.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

*P. aeruginosa* suşlarının saf kültürlerini elde etmek için kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Buradaki tek kolonilerden tekrar triptik soy agar besiyerine, tek koloni ekimi ile pasaj yapılarak bir gece inkübe edildi. Saf kültür halinde üreyen kolonilerden bir plastik öze dolusu alınarak 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 13 000 x g ve 4°C' de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Peletin üzerine 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı ve pelet süspanse edildi. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre ile 590 nm dalga boyunda 1 absorbans olacak şekilde ölçüldü.

#### 3.2.8.2. İzolatların Düşük Erime Isılı Agaroz Gömülmesi

Hücre süspansiyon tamponu içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı. Mikrodalga fırında agaroz çözüldükten sonra % 20'lik sodyum dodezil

sülfattan (SDS) 500 µl eklenerek karıştırıldı. 45-50°C'deki kuru ısı bloğunda bulunan mikrosantrifüj tüplere agaroz-SDS karışımından 200 µl dağıtıldı ve bu tüplerin üzerine bakteri süspansiyonundan 200 µl eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen şekilde dağılması sağlandı. Hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıbının kuyularına 100 µl dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi.

### **3.2.8.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Liziz Solüsyonu ile Parçalanması**

Steril kapaklı cam tüplerin (5 ml) herbirine 0.5 ml hücre liziz solüsyonu I eklendi. Katılaşmış halde bulunan düşük erime ısıly agaroz, kalıptan çıkarılarak cam tüplere yerleştirildi. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildikten sonra hücre liziz solüsyonu I dökülerek, yerine 0.5 ml hücre liziz solüsyonu II konuldu. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

### **3.2.8.4. Agaroz Kalıpların Yıkamaı**

İnkübasyon aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler 4°C'de 15 dakika bekletildi. Tüplerdeki hücre liziz solüsyonu II boşaltıldıktan sonra 50°C'de ısıtılmış olan steril ultra saf sudan 4 ml eklendi. Çalkalamalı su banyosunda 50°C'de 15 dakika süreyle 3 defa yıkama işlemi yapıldı. Agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere) 4 ml TE tamponuyla yıkanarak saflaştırılmış DNA elde edildi.

### **3.2.8.5. DNA'nın SpeI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi**

*P. aeruginosa* DNA'sını içeren kalıpların kesimi için *SpeI* RE kullanıldı. Lam üzerine alınan agaroz kalıbın bistürü kullanılarak ¼ oranında kesilen parçası 100 µl 1X *SpeI* (10µl 10X *SpeI* tamponu+ 90 µl distile su) tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Diğer agaroz parçaları TE tamponu içinde 4°C'de saklandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde (10 µl 10x *SpeI* tamponu, 20 U/µl *SpeI* enzimi, steril ultra saf su) karışım hazırlandı. Çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

### 3.2.8.6. DNA Kalıplarının Jele Yüklmesi ve Elektroferez

PFGE agaroz 100 ml 0.5X TBE (pH,8.4) içinde %1'lik olacak şekilde hazırlandı. Tris radikallerini uzaklaştırarak bant profillerinde oluşan "smear" görüntüyü ortadan kaldırmak amacıyla TBE tamponu içine 50 mM thiourea eklendi. Mikrodalga fırınında agaroz çözüldükten sonra 45-50°C'lik su banyosunda bekletildi. Restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri 15 kuyulu tarağın uç kısmına konuldu ve 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra tarak kaset içine yerleştirildi. Agaroz, kaset içine dökülerek oda ısısında katılaşmaya bırakıldı ve jel tam olarak donduktan sonra tarak çıkarıldı. Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılarak tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1.9 L 0.5X TBE tamponu (pH,8.4) bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

### 3.2.8.7. Elektroferez Programı

*P. aeruginosa* için "CHEF-Mapper Pulsed Field Electrophoresis System"de uygulanan elektroferez koşulları aşağıda özetlenmiştir:

Süre: 20 saat, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, başlangıç vuruş süresi: 5 sn, bitiş vuruş süresi: 45 sn, vuruş açısı: 120°, sıcaklık: 14°C.

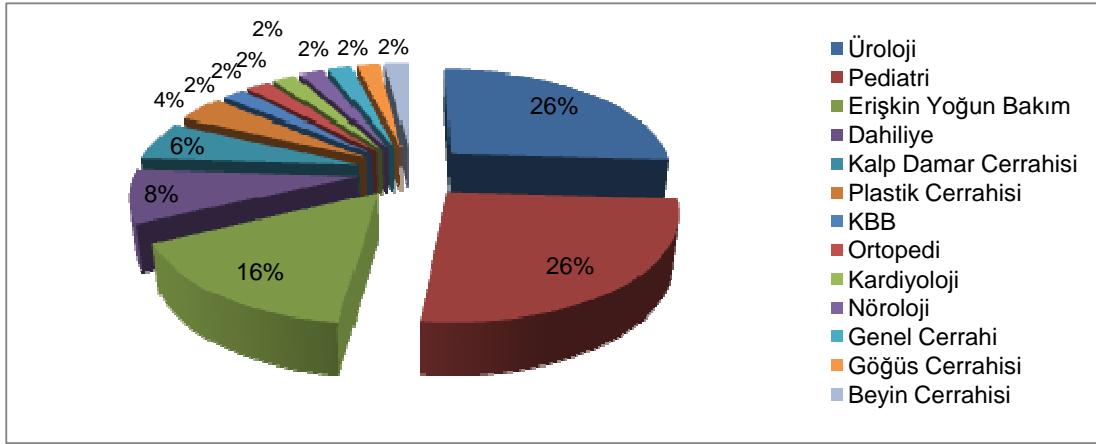
### 3.2.8.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elektroferez programı tamamlandıktan sonra elde edilen jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınarak 20 dakika süreyle boyandı. *ChemiDoc XRS* görüntüleme cihazı kullanılarak DNA bantları belirlendi. Quantitiy One&Software yazılım programı kullanılarak bant profilleri analiz edildi. UPGMA yöntemi kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı.

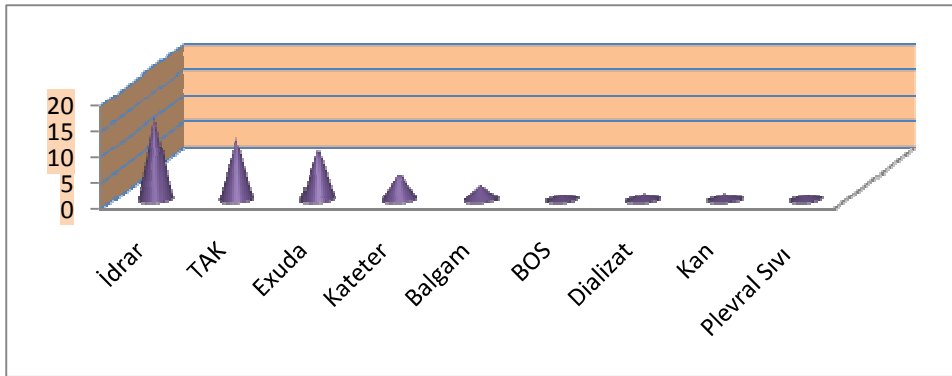
## 4. BULGULAR

### 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* Suşların İzole Edildikleri Örnek Türleri ve Klinik Servisler

Yapılan çalışmada Ocak 2007 - Ocak 2008 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli klinik ve polikliniklerinden, OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji SDL'ye gelen örneklerden izole edilmiş toplam 571 *P. aeruginosa* suşu içerisinde seftazidime dirençli olan 166 (%30) suştan, 50 ayrı hastadan izole edilen hastane infeksiyonu etkeni seftazidim dirençli 50 adet *P. aeruginosa* suşu kullanıldı. Bu suşların izole edildikleri örnek türleri ile servisler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de oranlarına göre verildi.



Şekil 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri servisler ve oranları



Şekil 4.2. *P. aeruginosa* suşlarının elde edildikleri örnek türleri

## 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Disk difüzyon duyarlılık testi sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* suşlarının aztreonam (ATM), sefepim (FEP), sefotaksim (CTX), piperasilin (PRL), piperasilin-tazobaktam (TZP), imipenem (IPM) ve meropenem (MEM) antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %100, %88, %100, %64, %50, %74 ve %70 olarak bulundu. Çift disk sinerji yöntemiyle 50 adet seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşunun 32 tanesinde (%64) GSBL pozitifliği saptandı. Şekil 4.3'de GSBL pozitifliği örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliği saptanan bir *P. aeruginosa* suşu

## 4.3. PZR Optimizasyon Sonuçları

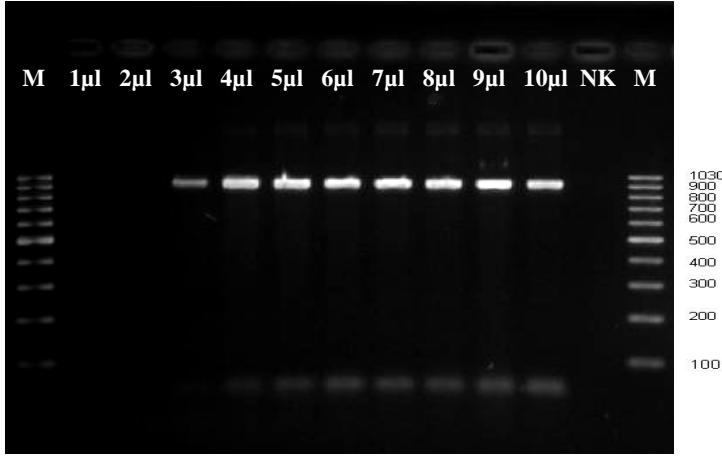
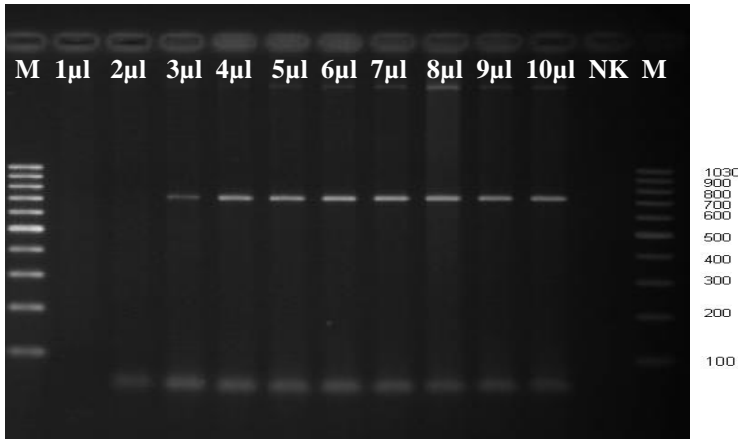
Duyarlılık test sonuçlarına göre seftazidim direnci saptanan 50 adet *P. aeruginosa* suşunda, PER ve OXA enzim varlığının belirlenmesinde kullanılacak olan PZR optimizasyon koşullarının sonuçları verilmiştir.

### a. Magnezyum Klorür Optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan magnezyum klorür optimizasyonunda 1,5-6 mM konsantrasyon aralığı çalışıldı. *PER-1* ve *OXA-10* genlerine spesifik primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon ürünlerinin görüntülemelerinde, en iyi bant profili veren 3.5 mM (5µl) MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu çalışmalarda kullanıldı. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları Tablo 4.1'de, bant profilleri ise Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar

| Magnezyum optimizasyonu                      | Tüp 1 | Tüp 2 | Tüp 3 | Tüp 4 | Tüp 5 | Tüp 6 | Tüp 7 | Tüp 8 | Tüp 9 | Tüp 10 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu (mM)        | 1,5   | 2     | 2,5   | 3     | 3,5   | 4     | 4,5   | 5     | 5.5   | 6      |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> miktarı (mikrolitre) | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10     |

**Şekil 4.4.** *PER-1* geni için magnezyum klorür optimizasyonu ile oluşan 960 bp'lik bant profilleri (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)**Şekil 4.5.** *OXA-10* geni için magnezyum klorür optimizasyonu sonucu elde edilen 720 bp'lik bant profilleri (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

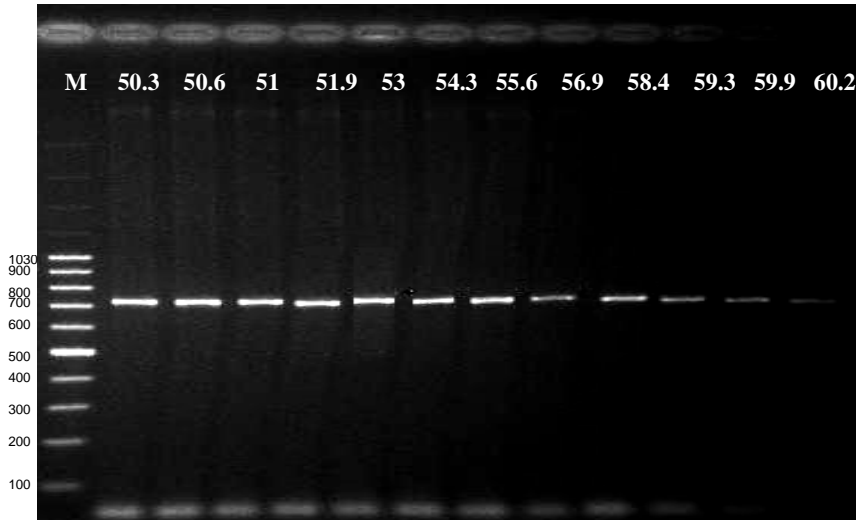


## b. Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

*PER-1* ve *OXA-10* gen bölgelerinin primer bağlanma ısılarının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında, 50-60 °C ısı aralığı kullanıldı. *PER-1* ve *OXA-10* primerleri için en uygun bağlanma ısısı 56 °C olarak belirlendi. Belirli sıcaklık aralıklarında oluşan bant profili görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



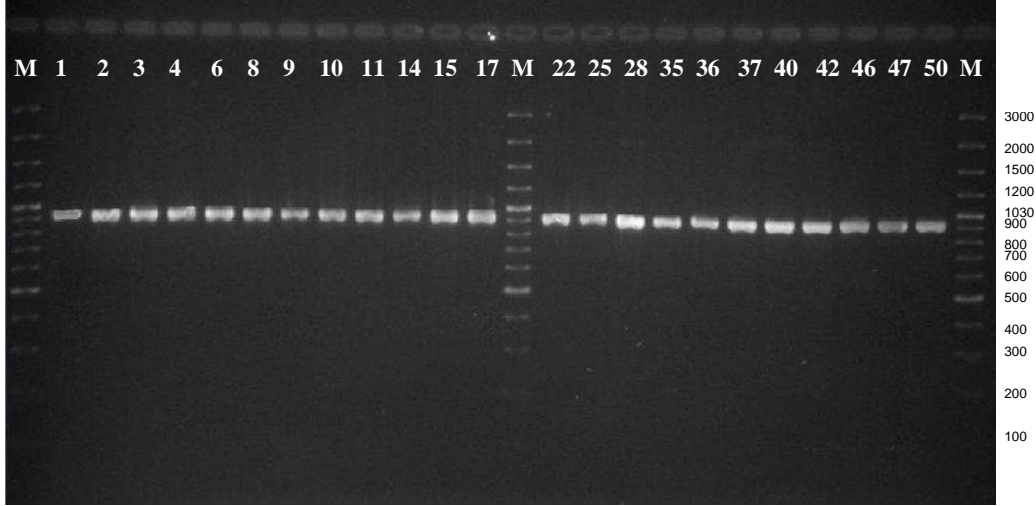
Şekil 4.6. *PER-1* gen bölgesi için primer bağlanma ısı optimizasyonu (M: Marker)



Şekil 4.7. *OXA-10* gen bölgesinin belirlenmesi için yapılan primer bağlanma ısı optimizasyonu (M: Marker)

#### 4.4. PZR Yöntemiyle *PER-1* Gen Bölgesinin Saptanması

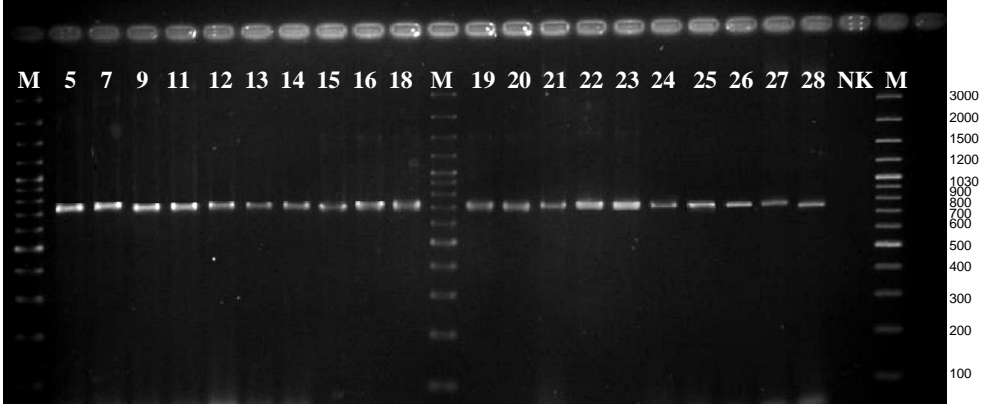
*P. aeruginosa* suşlarında *PER-1* enzimi kodlayan gen varlığı *PER-1A* ve *PER-1D* primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlendi. Toplam 23 adet suşta 960 bp'lik *PER-1* gen bölgesi saptandı ve jel görüntüleri Şekil 4.8'de verildi. *P. aeruginosa* suşları arasında *PER-1* genine sahip olanların oranı % 46 olarak bulundu.



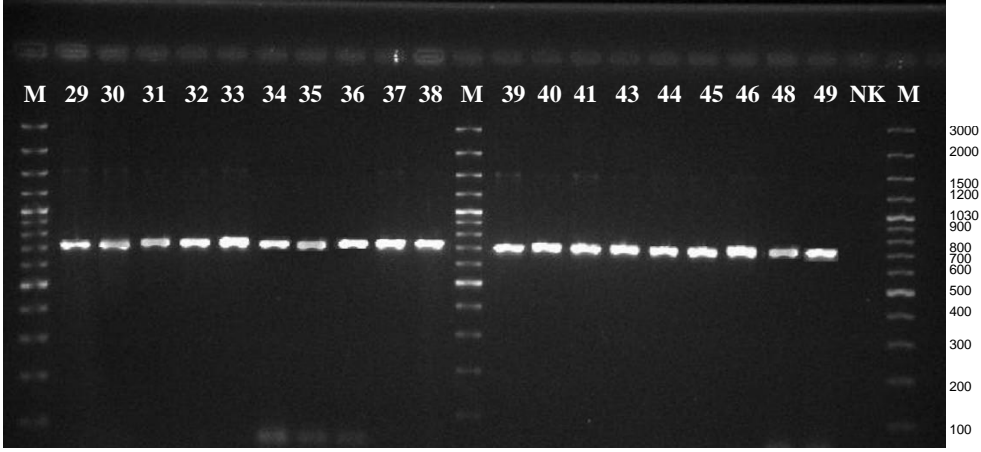
Şekil 4.8. *P. aeruginosa* suşlarında saptanan 960 bp'lik *PER-1* gen bölgeleri (M: Marker)

#### 4.5. PZR Yöntemiyle *OXA-10* Gen Bölgesinin Saptanması

*P. aeruginosa* suşlarında *OXA-10* (*OXA-11*, *OXA-14*, *OXA-15*, *OXA-16* ve *OXA-17*) DNA dizilerine uyumlu OPR-1 ve OPR-2 primerleri ile gerçekleştirilen PZR ile *OXA-10* grubu enzim varlığı araştırıldı. Otuz dokuz adet suşta, 720 bp'lik *OXA-10* gen bölgesinin varlığı belirlendi ve bant görüntüleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterildi. *P. aeruginosa* suşları arasında *OXA-10* grubu enzim üretenlerin oranı % 78 olarak bulundu.



**Şekil 4.9.** 5-28 no'lu suşların 720 bp büyüklüğündeki *OXA-10* gen bölgeleri  
(M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)



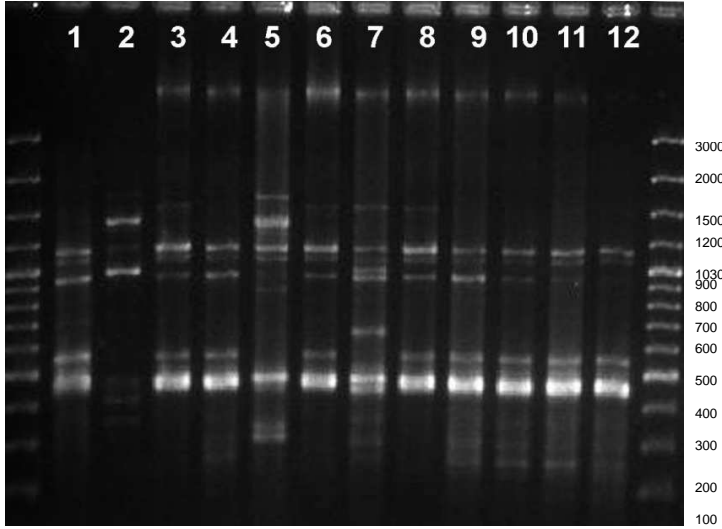
**Şekil 4.10.** 29-49 no'lu suşların 720 bp büyüklüğündeki *OXA-10* gen bölgeleri  
(M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

#### 4.6. PZR Yöntemi ile *PER-1* ve *OXA-10* Geni Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri

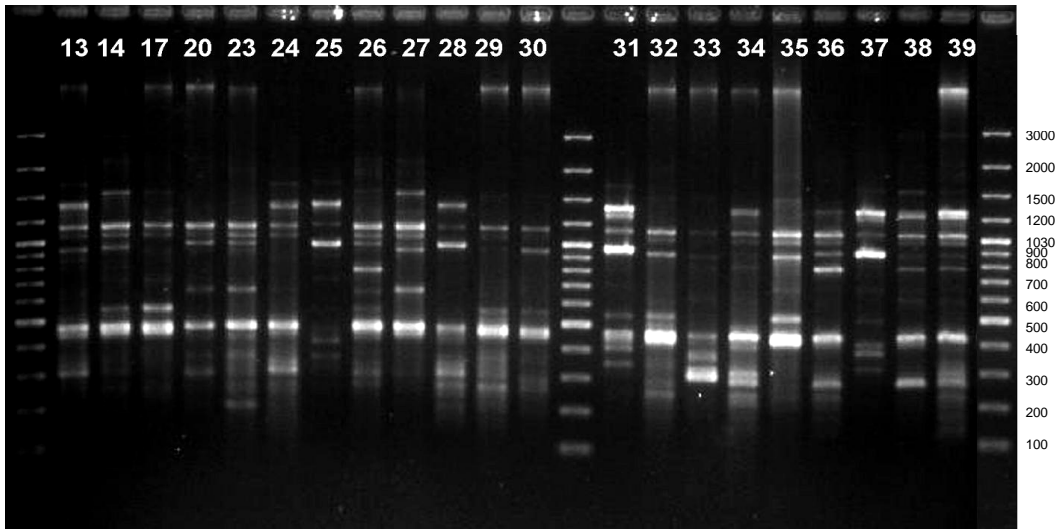
*PER-1* ve *OXA-10* geni taşıdığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarının seftazidim Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerleri CLSI kriterlerine göre yorumlandı. CLSI önerilerine göre *P. aeruginosa* için seftazidim MİK değeri  $\geq 32$  olduğunda dirençli olarak kabul edilmektedir. Tez çalışmasında kullanılan tüm suşların seftazidim MİK değerleri  $\geq 64$  ve üzeri olarak belirlenerek dirençli oldukları doğrulandı ve MİK değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

#### 4.7. *P. aeruginosa* Suşlarının Klonal Yakınlıkları

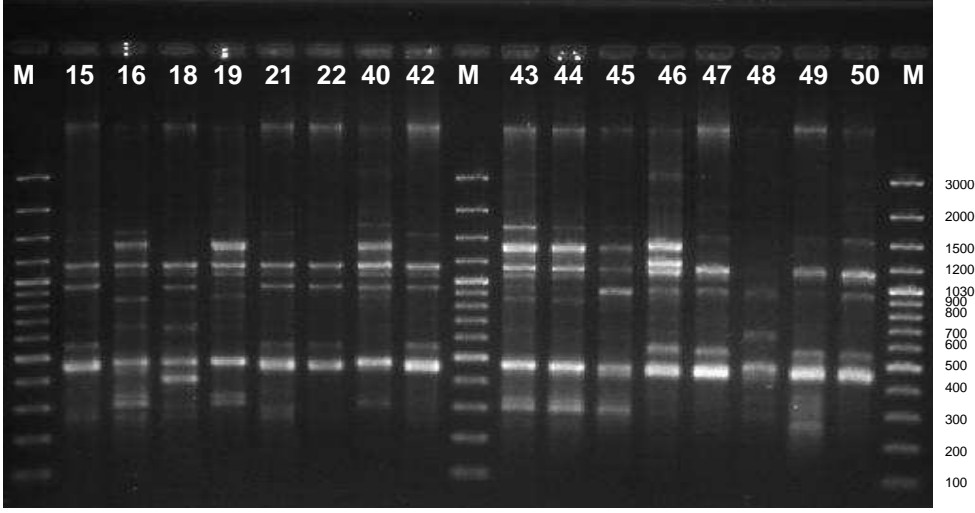
*PER-1* ve *OXA-10* gen bölgeleri saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının klonal yakınlıkları, ERIC dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PZR ile incelendi ve Şekil 4.11, Şekil 4.12 ile Şekil 4.13’de oluşan bant profili görüntüleri verildi.



Şekil 4.11. *PER-1* ve *OXA-10* geni tespit edilen 1-12 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları (M: Marker)

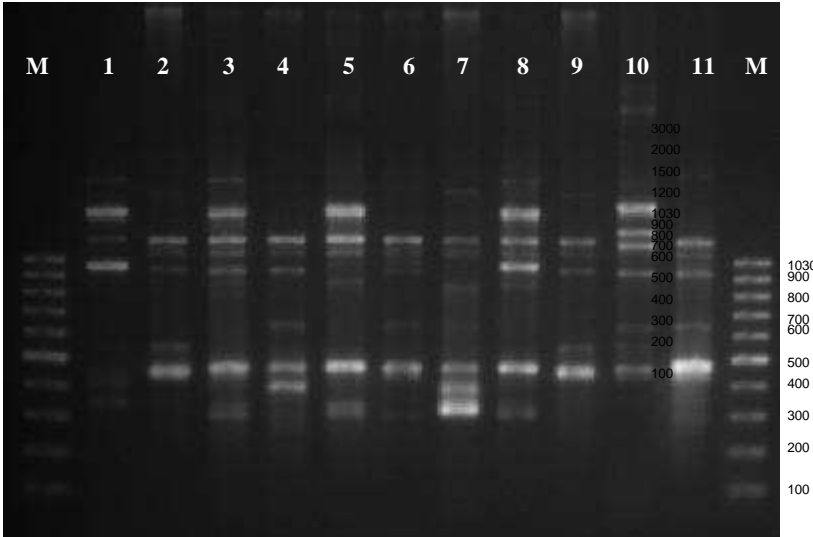


Şekil 4.12. *PER-1* ve *OXA-10* geni tespit edilen 13-39 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları (M: Marker)

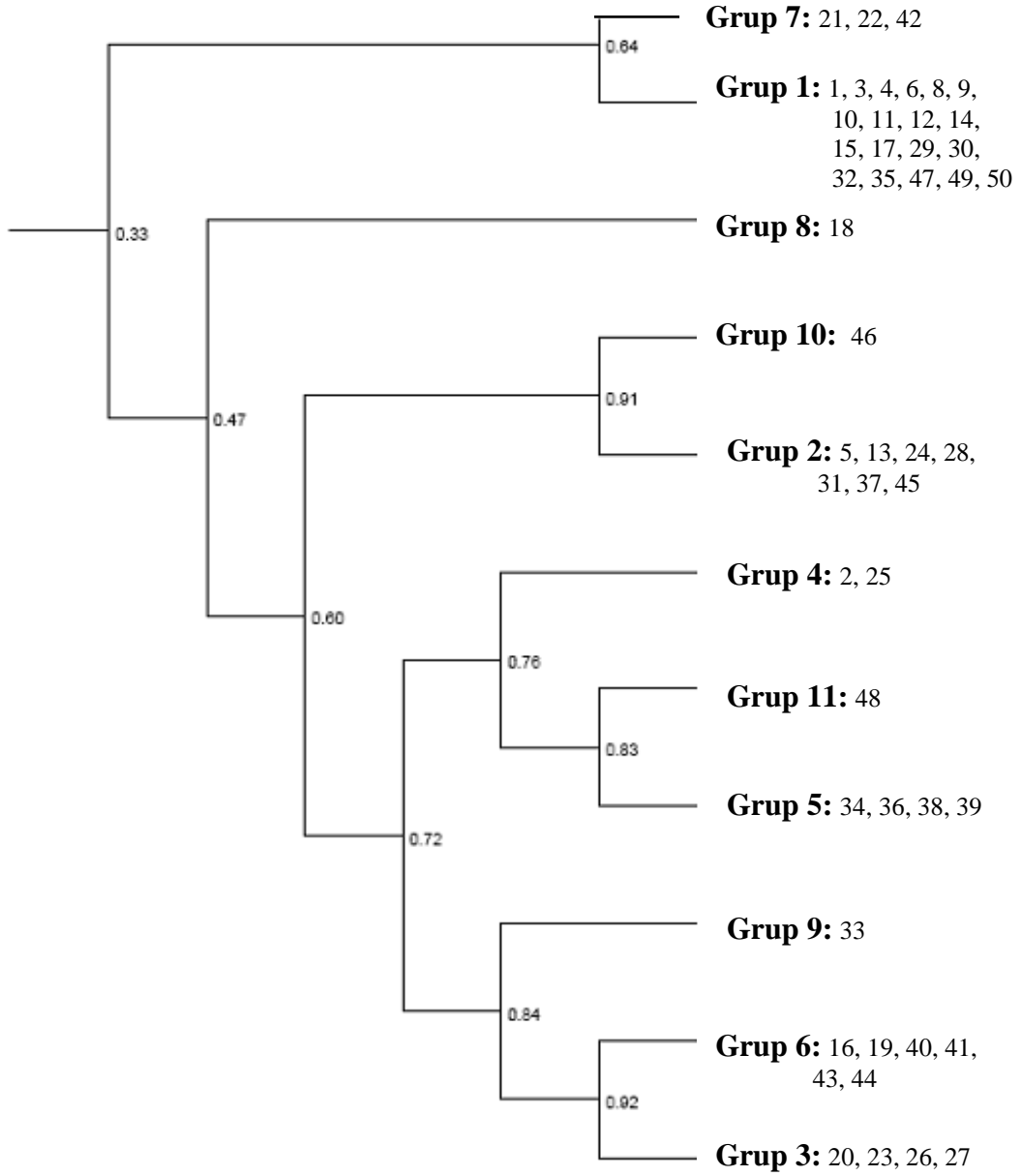


**Şekil 4.13.** *PER-1* ve *OXA-10* geni tespit edilen 15-42 ve 43-50 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları (M: Marker)

RAPD-PZR sonuçlarına göre tüm bantları birebir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir ve iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak yorumlandı, grup analizleri yapıldı ve tüm izolatlar bant profilleri göz önüne alınarak 11 grupta incelendi. Bu grupları temsil eden birer suş seçilerek bant profilleri Şekil 4.14'de gösterildi ve dendogram sonuçlarına Şekil 4.15'de yer verildi.



**Şekil 4.14.** *P. aeruginosa* izolatlarının RAPD-PZR sonuçları ile oluşturulan grup profilleri (M: Marker)



**Şekil 4.15.** *P. aeruginosa* suşlarının RAPD-PZR sonuçlarına göre çizilen dendrogramı

**Tablo 4.2.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri

|    | Servis        | Örnek Türü   | ÇDST | Disk Difüzyon Duyarlılık Sonuçları |     |     |     |     |     |     |     | Seftazidim MİK Değerleri | PZR Sonuçları |     | RAPD PZR |
|----|---------------|--------------|------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|---------------|-----|----------|
|    |               |              |      | CAZ                                | TZP | FEP | PRL | CTX | MEM | ATM | IPM |                          | PER           | OXA |          |
| 1  | Üroloji       | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  | +             |     | 1        |
| 2  | Dahiliye      | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | ≥1024-R                  | +             |     | 4        |
| 3  | Üroloji       | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    | +             |     | 1        |
| 4  | Üroloji       | Yara         | +    | R                                  | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  | +             |     | 1        |
| 5  | KVC           | TAK          | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 2        |
| 6  | Üroloji       | İdrar        |      | R                                  | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    | +             |     | 1        |
| 7  | KBB           | Yara         | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  |               | +   | 3        |
| 8  | Erişkin YB    | BOS          | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 128-R                    | +             |     | 1        |
| 9  | Üroloji       | İdrar        |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             | +   | 1        |
| 10 | Erişkin YB    | Kateter      | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    | +             |     | 1        |
| 11 | Üroloji       | İdrar        |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 128-R                    | +             | +   | 1        |
| 12 | Üroloji       | İdrar        |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    |               | +   | 1        |
| 13 | Pediatri      | TAK          | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | 128-R                    |               | +   | 2        |
| 14 | Erişkin YB    | TAK          | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    | +             | +   | 1        |
| 15 | Üroloji       | İdrar        | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             | +   | 1        |
| 16 | Plastik Cer.  | Yara         | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    |               | +   | 6        |
| 17 | Erişkin YB    | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             |     | 1        |
| 18 | Plastik Cer.  | Yara         |      | R                                  | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | 64-R                     |               | +   | 8        |
| 19 | Ped. Kard.    | TAK          | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    |               | +   | 6        |
| 20 | Genel Cer.    | Yara         | +    | R                                  | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    |               | +   | 3        |
| 21 | Ortopedi      | Yara         |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 7        |
| 22 | Erişkin YB    | TAK          | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    | +             | +   | 7        |
| 23 | Üroloji       | TAK          | +    | R                                  | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  |               | +   | 3        |
| 24 | Pediatri İnf. | Kateter      |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    |               | +   | 2        |
| 25 | Erişkin YB    | Plevral Sıvı |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 64-R                     | +             | +   | 4        |
| 26 | Pediatri      | TAK          | +    | R                                  | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | 256-R                    |               | +   | 3        |
| 27 | Üroloji       | Yara         |      | R                                  | S   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    |               | +   | 3        |
| 28 | Üroloji       | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 64-R                     | +             | +   | 2        |
| 29 | Göğüs Cer.    | TAK          | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 1        |
| 30 | Dahiliye      | Kateter      |      | R                                  | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | 256-R                    |               | +   | 1        |
| 31 | Pediatri      | İdrar        |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 128-R                    |               | +   | 2        |
| 32 | Beyin Cer.    | İdrar        | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 512-R                    |               | +   | 1        |
| 33 | Pediatri YB   | TAK          | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 9        |
| 34 | Pediatri İnf. | Balgam       | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    |               | +   | 5        |
| 35 | Üroloji       | İdrar        | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  | +             | +   | 1        |
| 36 | KVC           | Yara         |      | R                                  | S   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | 128-R                    | +             | +   | 5        |
| 37 | KVC           | Yara         | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             | +   | 2        |
| 38 | Kardioloji    | Dializat     |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | ≥1024-R                  |               | +   | 5        |
| 39 | Pediatri YB   | Kateter      | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    |               | +   | 5        |
| 40 | Ped. Cer.     | Yara         | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    | +             | +   | 6        |
| 41 | Pediatri İnf. | TAK          |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    |               | +   | 6        |
| 42 | Erişkin YB    | TAK          |      | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 256-R                    | +             |     | 7        |
| 43 | Pediatri      | İdrar        | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 512-R                    |               | +   | 6        |
| 44 | Pediatri      | TAK          | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 6        |
| 45 | Pediatri      | Kateter      |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    |               | +   | 2        |
| 46 | Dahiliye      | İdrar        |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             | +   | 10       |
| 47 | Üroloji       | İdrar        |      | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 128-R                    | +             |     | 1        |
| 48 | Dahiliye      | Kan          | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | 512-R                    |               | +   | 11       |
| 49 | Erişkin YB    | Balgam       | +    | R                                  | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 64-R                     |               | +   | 1        |
| 50 | Nöroloji      | Balgam       | +    | R                                  | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 256-R                    | +             |     | 1        |

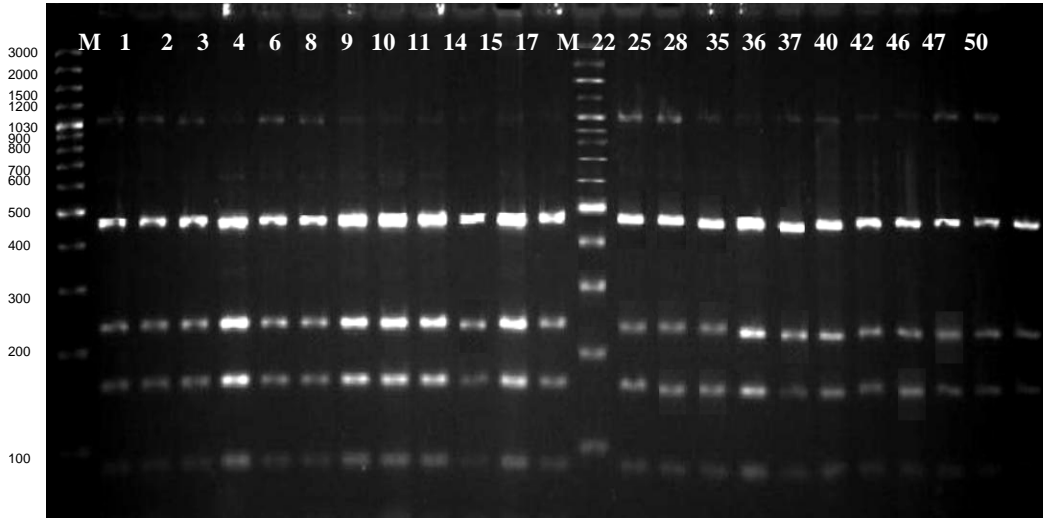
KVC: Kardiyovasküler Cerrahi, TAK:Trakeal aspirat, KBB:Kulak burun boğaz, YB:Yoğun bakım, BOS:Beyin omurilik sıvısı, R:Dirençli, S:Duyarlı,

#### 4.8. *P. aeruginosa* Suşlarının Restriksiyon Analizleri

*PER-1* ve *OXA-10* genleri varlığı saptanan izolatların PZR ürünlerinin restriksiyon analizleri RFLP yöntemi ile yapıldı.

##### 4.8.1. *PER-1* Geni PZR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi

*PER-1* geni saptanan izolatların PZR ürünlerinin *PvuII* ve *StuI* enzimleri kullanılarak restriksiyon analizleri yapıldı. *PER-1* amplifikasyon ürünü *StuI* ile *PER-2* amplifikasyon ürünü ise *PvuII* RE ile kesilemediğinden dolayı bu enzimler kullanılarak iki farklı gen bölgesi ayırt edilebilmektedir. Restriksiyon analizi uygulanan toplam 23 PZR ürünününün *PvuII* ile 450, 230, 158 ve 85 bp'lik parçalara ayrılması, buna karşın *StuI* ile hiçbir değişime uğramaması, ürünlerin *PER-1* genine ait olduğunu göstermektedir (Nordmann and Naas, 1994). RFLP analiz sonuçları Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.



**Şekil 4.16.** *PvuII* ile kesim sonrası elde edilen 450, 230, 158 ve 85 bp'lik DNA fragmentlerinin gösterilmesi (M: Marker)

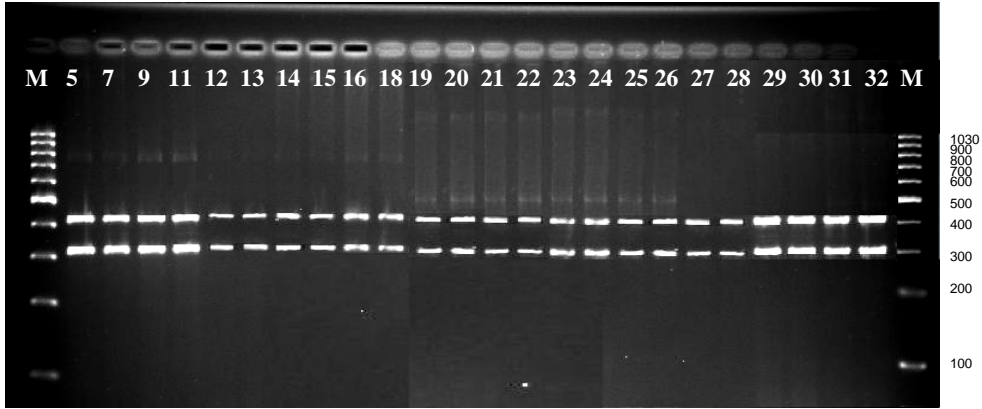




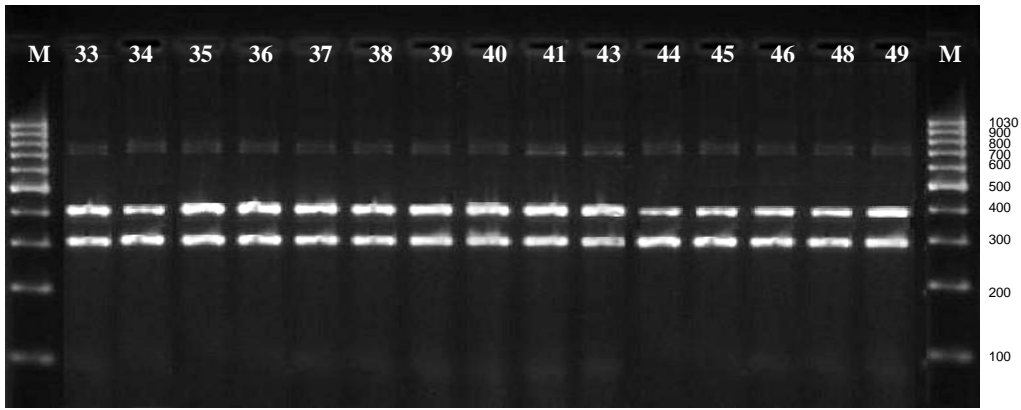
**Şekil 4.17.** *StuI* enzimi ile kesilmeyen 960 bp'lik *PER-1* gen bölgeleri (M: Marker)

#### 4.8.2. OXA-10 Geni PZR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi

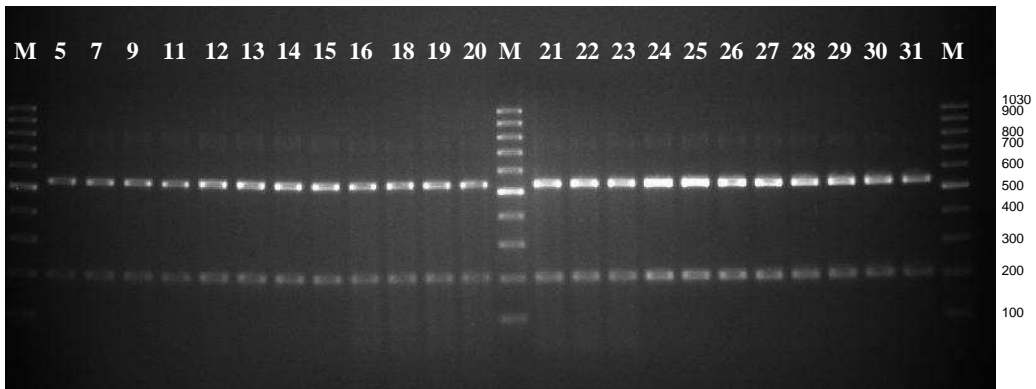
*OXA-10* gen bölgesi saptanan izolatların PZR ürünlerinin *PvuII* ve *HaeIII* enzimleri kullanılarak restriksiyon analizleri yapıldı. *OXA-10* amplifikasyon ürünlerinin *PvuII* enzimi ile, 408 ve 312 bp'lik iki fragmente ayrılması bu gen bölgesinin *OXA-10* ailesine ait olduğunu gösterdi. Bir sonraki basamakta ise *OXA-10* geni saptanan 39 izolatın PZR ampliconları *HaeIII* RE enzimi ile kesildi. 720 bp'lik *OXA-10* gen bölgelerinin *HaeIII* enzimi kullanılarak 524 ve 196 bp'lik iki fragmente ayrılması ile *OXA-11/ 14/ 16* enzim tipleri belirlendi. Şekil 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21'de restriksiyon analizlerinin jel görüntüleri, Şekil 4.22'de restriksiyon analiz basamakları verilmiştir.



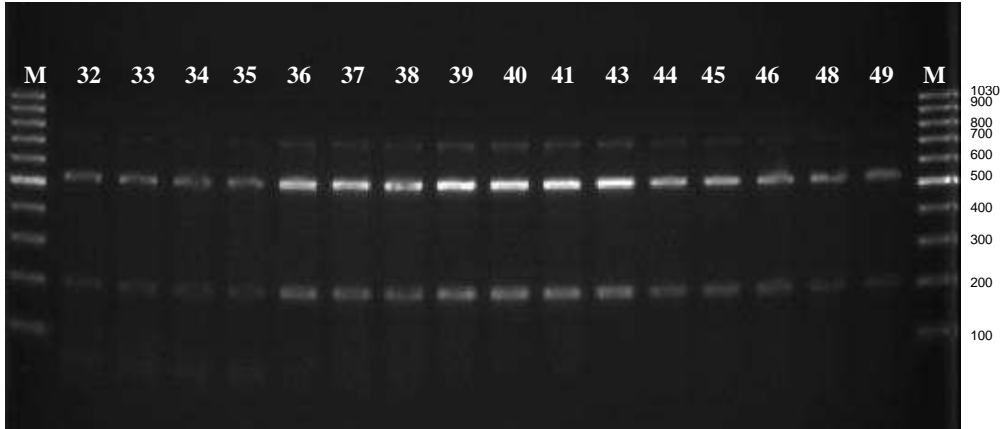
**Şekil 4.18.** *PvuII* ile kesim sonrası elde edilen 5-32 no'lu suşların 408 ve 312 bp'lik *OXA-10* gen bölgeleri (M: Marker)



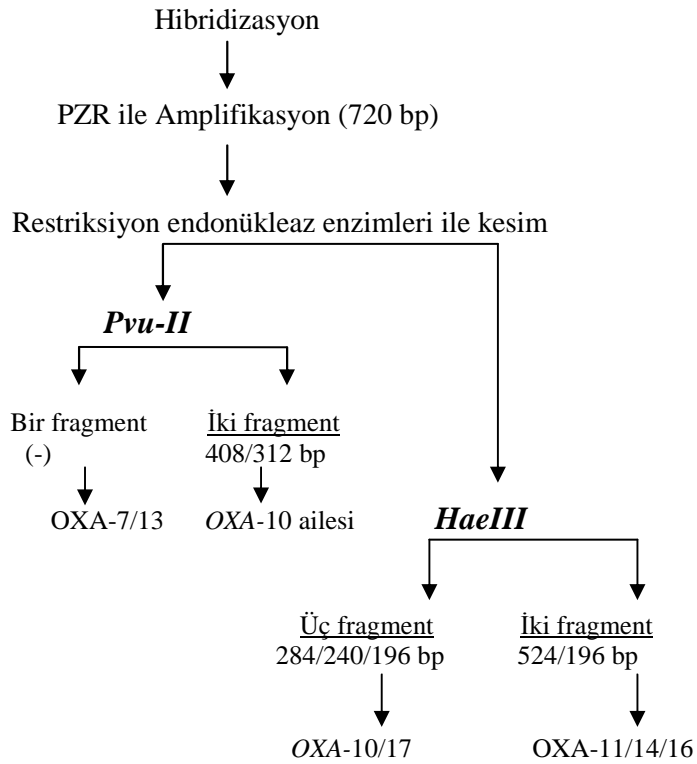
**Şekil 4.19.** *PvuII* ile kesim sonrası elde edilen 33-49 no'lu suşların 408 ve 312 bp'lik *OXA-10* gen bölgeleri (M: Marker)



**Şekil 4.20.** *HaeIII* ile kesim sonrası elde edilen 5-32 no'lu suşların 196 ve 524 bp'lik *OXA-10* gen bölgeleri (M: Marker)



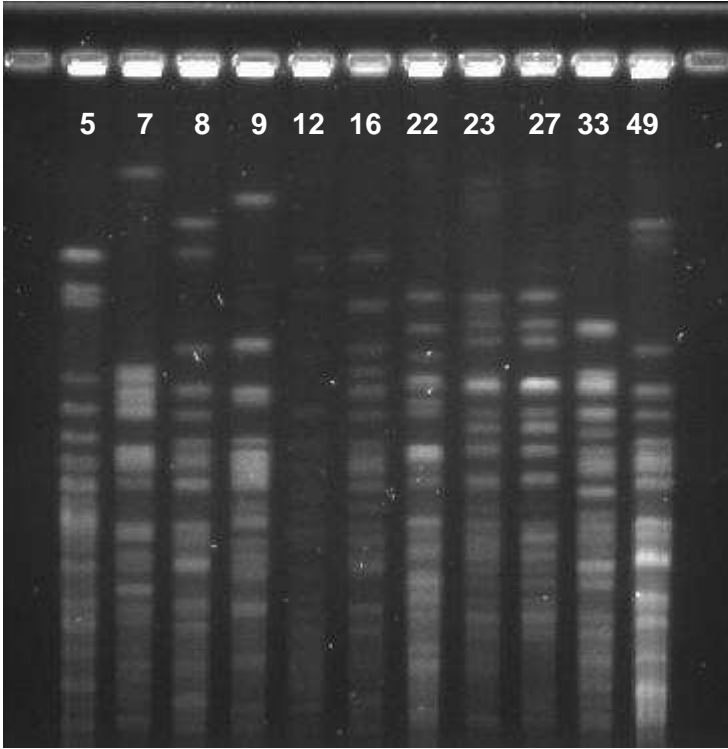
**Şekil 4.21.** *HaeIII* ile kesim sonrası elde edilen 33-49 no'lu suşların 196 ve 524 bp'lik *OXA-10* gen bölgeleri (M: Marker)



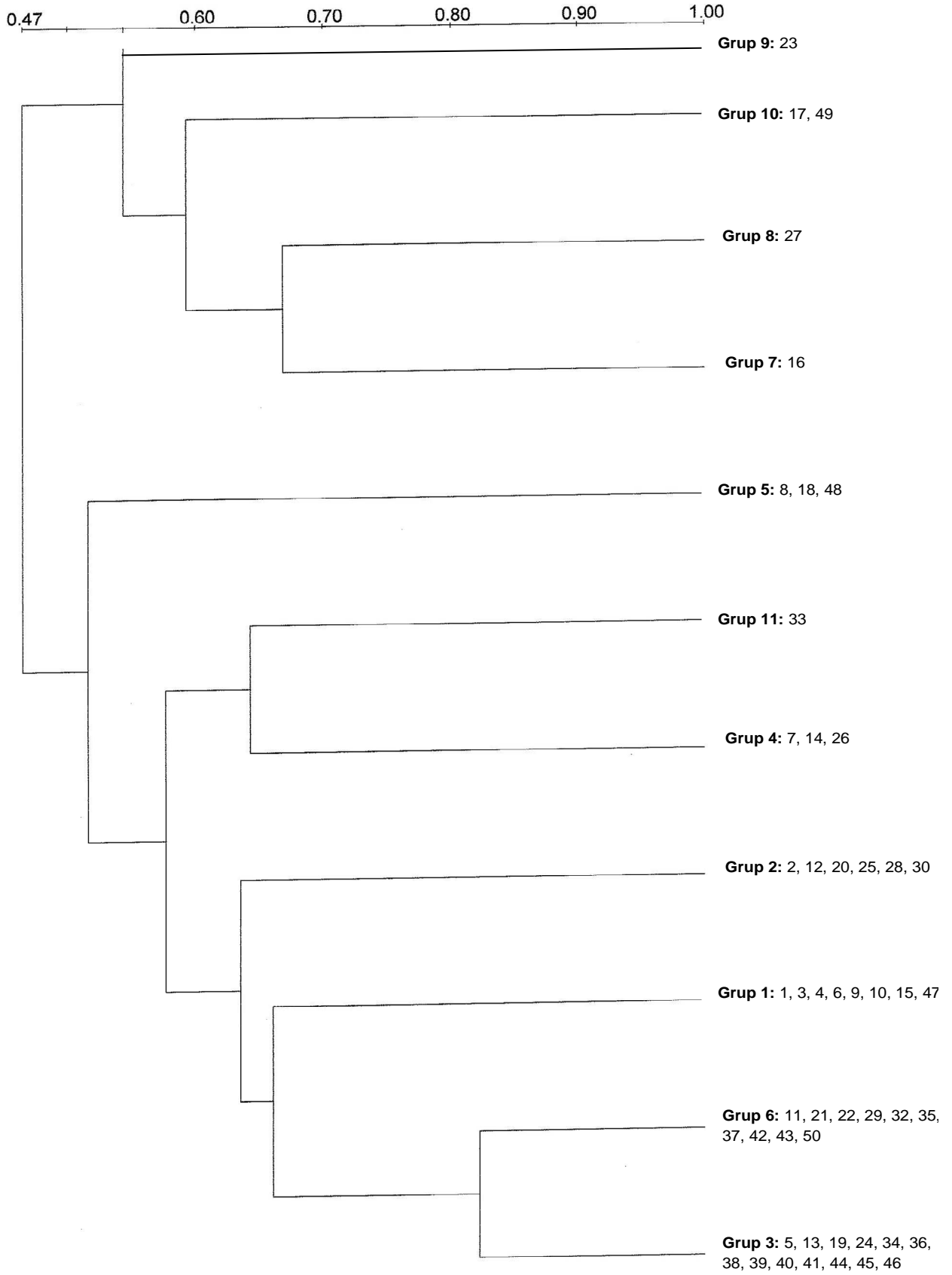
**Şekil 4.22.** *OXA-10* PZR ürünlerinin restriksiyon analizi basamakları (Vahaboğlu ve ark., 1998)

#### 4.9. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının PFGE Yöntemi ile Epidemiyolojik Analizi

*P. aeruginosa* suşlarına uygulanan PFGE'nin farklı aşamalarından sonra elde edilen bant profilleri değerlendirildi. Tenover kriterlerine göre suşların epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapıldı. İzolatlara ait grupları temsil eden bant profilleri Şekil 4.23' de gösterilmektedir. Bu suşları temsil eden gruplar belirlenerek UPGMA programıyla çizilen dendogram Şekil 4.24'de verilmektedir.



**Şekil 4.23.** *P. aeruginosa* suşlarına ait grupları temsil eden PFGE profilleri



**Şekil 4.24.** *P. aeruginosa* suşlarının 11 adet grubunu temsil eden PFGE dendogramı

## 5. TARTIŞMA

*P. aeruginosa*, sadece sınırlı sayıda antibiyotiğe hassasiyet gösteren, artan antibiyotik direnci ile önemli bir sorun haline gelen, özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastane infeksiyonlardaki rolünden dolayı infeksiyon hastalıkları alanında önemli bir yere sahip olan virulan bir mikroorganizmadır (Güner, 2003; Fidan ve ark., 2005; Haris et al., 1999). Yüzeysel bir deri infeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli infeksiyonlara neden olabilir (Kıska ve Gilligan, 2003). *P. aeruginosa*'da GSBL'ler özellikle hastane infeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır (Eraç, 2006). PER-1 ve OXA tipi GSBL'ler başlıca *P. aeruginosa*'da bulunurlar ve seftazidim direncinden sorumludurlar. Hastane infeksiyonları epidemiyolojisi ve kontrolünde klasik mikrobiyolojik yöntemlerin yanısıra son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmeler infeksiyonların hızlı tanısı, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanması, antibiyotik direncinin belirlenmesi, izlemi ve hastane infeksiyonları epidemiyolojisi konularında yeni açılımlar sağlamaktadır (Stratton ve Grene, 2004; Singh et al., 2006; Andrei ve Zervos, 2006).

*P. aeruginosa* kökenleri Aydın ve ark.(2000) tarafından yapılan çalışmada; en sık idrardan (%33.8), ikinci sıklıkta püydenden (%23.8) ve üçüncü sıklıkta yanık örneklerinden (%20.6) tespit edilmiştir. Turgut ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* kökenleri %39.5 ile en sık idrardan ve %37.2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan, %20.6 ile üçüncü sıklıkta ise yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Akçay ve ark. (2003) ise çalışmalarında, *P. aeruginosa* kökenlerini %45 ile en sık trakeal aspirat örneklerinden, ikinci sıklıkta %23 ile idrar örneklerinden, üçüncü sıklıkta %21 ile yara örneklerinden elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada; seftazidim dirençli hastane infeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşları, en sık idrar örneklerinden (%32) izole edilmiştir. İkinci ve üçüncü sıklıkta ise trakeal aspirat (%24) ve yara örnekleri (%20) gelmektedir.

*P. aeruginosa* suşlarının servislere göre dağılımının incelendiği Bayramoğlu'nun (2004) çalışmasında; *P. aeruginosa* kökenleri en sık pediatri servisinden (%32.4), ikinci sıklıkta YBÜ'den (%9.9), üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi servisinden (%7) elde edilmiştir. Gündüz ve ark. (2003) ise, *P. aeruginosa* kökenlerini en sık YBÜ'den (%43.3), ikinci sıklıkta kulak burun boğaz servisinden (18), üçüncü sıklıkta cerrahi servisinden (%8.6) saptadıklarını bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *P. aeruginosa* suşları en sık üroloji (%26) ve pediatri servislerinden (%26), (pediatri yoğun bakım, pediatrik cerrahi, pediatrik infeksiyon ve pediatrik kardiyoloji), ikinci sıklıkta YBÜ'den (%16) ve üçüncü sıklıkta dahiliye servisinden (%8) izole edilmiştir.

Türkiye genelinde farklı bölgelerdeki yedi üniversite hastanesinin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında IPM, FEP ve ATM antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %60.9, %91.3 ve %98.9 olarak saptanmıştır (Kolaylı ve ark., 2005). Aktaş ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmaya göre İstanbul'da Şubat 1999- Şubat 2000 tarihleri arasında hastane infeksiyonu etkeni 287 *P. aeruginosa* suşundan %39'u seftazidime dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmaya göre yoğun bakım ünitesi izolatlarında seftazidim direnci %62'dir. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen 49 suşun çoğul dirençli olduğu; %98'inin imipeneme, %92'sinin aztreonama, %96'sının sefepime, %41'inin piperasiline ve %37'sinin piperasilintazobaktama dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu oranlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz direnç oranlarına (aztreonam, sefepim, sefotaksim, piperasilin, piperasilintazobaktam, imipenem ve meropenem antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %100, %88, %100, %64, %50, %74 ve %70) yakın olmakla birlikte, Türkiye'de seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'ların diğer beta-laktam antibiyotiklere de önemli oranda dirençli olduğunu göstermektedir.

Vahaboğlu ve ark. (1997) tarafından yürütülen; Türkiye'nin farklı bölgelerindeki hastanelerde PER-1 prevalansının araştırıldığı çok merkezli çalışmada, PER-1 üreten suşların çoğunlukla imipenem ve meropeneme duyarlı oldukları belirtilmektedir. *P. aeruginosa* suşlarımızın çeşitli beta-laktam antibiyotiklere karşı disk difüzyon yöntemiyle belirlenen direnç oranları karşılaştırıldığında arada önemli bir farkın olmadığı saptanmıştır. Türkiye'de son yıllarda gerçekleştirilen bir diğer çok merkezli

çalışmada, üçüncü kuşak sefalosporin, karbapenem, aminoglikozit ve kinolon grubu antibiyotikler kullanılarak belirlenen çoklu antibiyotik direnç fenotipi açısından PER-1 geni içeren ve içermeyen suşlar arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Kolaylı ve ark., 2005). Hastanemizde izole edilen hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik duyarlılık testleri ile seftazidim direncinin yanısıra piperasilin (PRL), piperasilin-tazobaktam (TP), aztreonam (ATM), sefotaksim (CTX), imipenem (IMP), meropenem (MEM) ve sefepim (FEP) antibiyotiklerine direnç ve GSBL üretimi gibi özellikler de incelenmiştir. Genel olarak, seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu, incelenen ajanlar içinde en etkili olanların piperasilin-tazobaktam ve meropenem olduğu belirlenmiştir.

Aktaş ve ark. (2005)'nin yapmış olduğu çalışmada; yoğun bakım ünitesinden izole edilen CAZ dirençli *P. aeruginosa* suşlarında CAZ, ATM ve tikarsilin-klavulanik asit (75 µg + 10 µg) diskleri kullanılarak gerçekleştirilen çift disk sinerji testiyle % 42.9 oranında GSBL varlığı saptanabilmiştir. Eraç (2006)'ın yaptığı çalışmada, CAZ, FEP, CTX, AMC ve ATM diskleri ile GSBL varlığı taranmış, bu şekilde PER-1 geni varlığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarında %83.3 oranında GSBL pozitifliği tespit edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çoğul dirençli 50 *P. aeruginosa* suşunun incelendiği diğer bir çalışmada, çift disk sinerji testiyle %18 oranında GSBL pozitifliği saptanırken, PZR yöntemiyle %44 oranında PER-1 geni varlığı, %46 oranında OXA-10 geni pozitifliği tespit edilmiştir (Çelik, 2007). Çalışmamızda incelenen suşlarda CAZ, FEP, ATM ve PIP diskleri ile amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski kullanılarak GSBL varlığı tarandı ve bu şekilde *P. aeruginosa* suşlarının 32'sinde (%64) GSBL pozitifliği saptandı. Elde edilen bu bulgular PER-1 üreten *P. aeruginosa* suşlarının saptanmasında çift disk sinerji yönteminin güvenilir olmadığı yönündeki sonuçları desteklemektedir. Bu verilere göre *P. aeruginosa*'da çift disk sinerji testinin yalancı negatif sonuç verebileceği göz önüne alınarak, bu test ile belirlenen negatifliğin başka yöntemlerle doğrulanması gerektiği gözlemlenmiştir.



Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların kültüre dayalı duyarlılık testleri ile saptanması özel tekniklerin uygulanmasını gerektirmektedir. Bu yöntemler GSBL varlığını her zaman belirleyememektedir. GSBL saptanması hem tedavide doğru antibiyotiklerin seçilmesi hem de GSBL taşıyan bakterilerin epidemiyolojik açıdan izlenmelerinde oldukça önemlidir. Moleküler yöntemlerle GSBL üreten bakteriler hem klinik örneklerde doğrudan saptanabilmekte hem de türleri kesin olarak belirlenebilmektedir (Corinne et al., 2001).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda, PER-1'in tanımlanmasında izoelektrik odaklama (İEO), antibiyogram paterni/çift disk sinerji testi gibi fenotipik yöntemler ile koloni hibridizasyon, PZR, dizi analizi gibi genotipik yöntemler birarada kullanılmıştır (Nordmann et al., 1993; Nordmann ve Naas, 1994; Vahaboğlu ve ark.,1997). PER-1 enziminin daha çok *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi çoğul dirençli hastane infeksiyonu etkeni suşlar tarafından sentezlendiği gözlenmektedir. Bu suşlarda aynı zamanda AmpC tipi enzimlerin aşırı üretimi, metallo beta-laktamazlar ve OXA türevleri gibi farklı grup enzimlerin eş zamanlı ekspresyonu, dış membran geçirgenliğinde azalma ve aktif pompa sistemleri gibi direnç mekanizmalarının devreye girmesi söz konusu olduğundan, PER-1 enzimi varlığının antibiyogram paterni veya çift disk sinerji gibi fenotipik yöntemler ile taranmasını güçleştirmektedir. TEM-1 gibi beta-laktamazların izoelektrik noktalarının PER-1'e çok yakın oluşu ve çeşitli faktörlerin etkilerine duyarlı bir yöntem olması nedeniyle izoelektrik odaklama tekniği tanımlamada tek başına kullanılamamaktadır. PZR ve dizi analizi yöntemleri daha güvenilir olmaları nedeniyle PER-1'in belirlenmesinde tercih edilmektedir (Weldhagen et al., 2003). Türkiye'de sekiz üniversite hastanesinde, yaklaşık üç aylık bir süre içinde hastane kökenli *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve *K. pneumoniae* türlerinde, koloni hibridizasyon ve İEO teknikleriyle PER-1 varlığı araştırılmış, *P.aeruginosa*'da %11, *Acinetobacter* spp.'de %46 oranında PER-1 pozitifliği saptanırken, *K. pneumoniae* suşlarının hiçbirinde bu enzim belirlenememiştir (Vahaboğlu ve ark., 1997). Aynı tarihlerde ülkemizde üç farklı hastaneden üç aylık bir süreçte izole edilmiş hastane kaynaklı *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında, PER-1 pozitifliği oranı sırasıyla %23,7 ve %62 olarak tespit edilmiştir (Vahaboğlu ve ark., 1998).

Beta-laktam antibiyotiklerin kullanım prensiplerindeki farklılara bağlı olarak beta-laktamazların prevalansı ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hatta hastaneden hastaneye değişmektedir (Gülay ve ark., 2001). TEM veya SHV grubu GSBL olmayan PER-1 enzimi, ilk kez 1991 yılında Fransa’da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (Nordmann et al., 1993). 1991-1993 yılları arasında Ankara’da seftazidim dirençli 14 *P. aeruginosa* suşunda da PER-1 enzime rastlanmıştır, ardından ülke çapında gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada söz konusu enzimin *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında da yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır (Danel et al., 1995; Vahaboğlu ve ark., 1997).

Vahaboğlu ve ark. (1997) Türkiye’nin yedi coğrafik bölgesinde lokalize olan sekiz farklı üniversite hastanesinden üç aylık bir periyotta elde edilen 72 *Acinetobacter spp.*, 92 *Klebsiella spp.* ve 367 *P. aeruginosa* olmak üzere toplam 531 izolatla yürüttükleri çalışmanın sonucunda *Acinetobacter spp.*’lerin %76’sının, *Klebsiella spp.*’lerin %39’unun ve *P. aeruginosa*’ların %28’inin seftazidime dirençli olduğunu saptamışlardır. Seftazidime dirençli olan *P. aeruginosa*’ların %38’inde PER-1 enzimi pozitif bulunmuştur. Vahaboğlu ve ark. (1998)’nin yaptıkları diğer bir çalışmada; 76 *P. aeruginosa* izolatından 18’inin (%23.7) PER-1, 4’ünün (%5.3) OXA-10 enzimini tek başına, 8 izolatın (%10.5) ise her iki beta-laktamızı birarada ürettiği belirlenmiştir.

OXA-10 türevi enzimlerden OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17, ilk olarak Ankara’da Gür ve ark. tarafından izole edilmiştir (Hall et al., 1993; Danel et al., 1997; 1998; 2001). İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde yapılan çalışmada, 50 adet seftazidime dirençli *P. aeruginosa* suşunun 23’ünde (%46) OXA-10 türevi enzimler saptanmıştır (Çelik, 2007). OXA-10 türevleri, GSBL tipi OXA enzimlerini genel olarak içerdiği için çalışmamızda, OXA-10 gen bölgesine yönelik ortak primer kullanılmış ve toplam 39 izolatta (%78) OXA-10 türevi GSBL enzimi pozitif olarak bulunmuştur.

Aktaş ve ark. (2005)’na ait farklı bir çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım servislerinden 1999-2000 yılları arasında izole edilmiş *P. aeruginosa* izolatlarının, seftazidim direncinden sorumlu olabilecek PER-1 oranı %86, OXA-10 türevleri oranı %55, PER-1 ve OXA-10 türevleri birlikteliği %48 oranında bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre; hastana etkeni seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında %46 oranında PER-1, %78 oranında OXA-10 türevi beta-laktamaz enzimi üretimi ve %24 oranında ise PER-1 ve OXA-10 türevi enzimlerin birlikteliği tespit edilmiştir. PZR yöntemi ile yaptığımız çalışmada, PER-1 ve OXA-10 geni taşıdığı saptanan suşlardan hiçbirinde seftazidim MİK değerinin 64µg/ml'nin altında olmaması, bu enzimlerin seftazidime karşı yüksek etkinliğinin olduğunu ortaya koymaktadır.

PER-2 enzimi, aminoasit dizisi açısından PER-1 ile %86,4 benzerlik gösteren bir GSBL'dir ve günümüze kadar sadece Güney Amerika ülkelerinde çoğunlukla *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu suşlarda saptanmıştır (Bauerfeind et al., 1996; Vignoli et al., 2005; Celenza et al., 2006). İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada PER-1 geninin *StuI* enzimiyle, PER-2 geninin ise *PvuII* enzimiyle kesilmemesi bilgisinden yola çıkılarak, PZR ürünlerinin restriksiyon analizi ile PER-1/PER-2 ayrımının yapılabileceği gösterilmiştir (Luzzaro et al., 2001). Dokuz Eylül Üniversitesi hastanesinde *P. aeruginosa* suşlarının farklı ERIC-PZR paternlerine ait temsilcilerinde PER-1 geni PZR ürünlerinin restriksiyon analizi yapılmış ve tüm PZR ürünlerinin *PvuII* ile dört parçaya ayrılması sonucunda ürünlerin PER-1 genine ait olduğu gösterilmiştir (Eraç, 2006). Yaptığımız çalışmada PER-1 geni saptanan *P. aeruginosa* suşlarında PZR ürünlerinin *PvuII* ve *StuI* enzimleri kullanılarak restriksiyon analizleri yapılmıştır. PZR ürünlerinin tümünün *StuI* enziminden etkilenmeyerek, *PvuII* ile dört fragmente ayrılması ürünlerin tamamının PER-1 genine ait olduğunu göstermiştir.

Fransa, İtalya, Belçika ve Kore gibi ülkelerde de PER-1 enzimi saptanan *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus mirabilis* ve *Alcaligenes faecalis* suşları bildirilmiştir (Pereria et al., 2000; Luzzaro et al., 2001; Yong et al., 2003). Ancak bu ülkelerde PER-1 enziminin genel prevalansını ortaya koyan çok merkezli çalışmalara rastlamak güçtür. 2001-2002 yılları arasında orta Fransa'da dokuz hastanenin katılımıyla gerçekleştirilen çalışmada toplam 5304 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatından 37'sinde (%0.7) PER-1 geni varlığı tespit edilmiştir (De Champs et al., 2004). Moleküler tiplendirme çalışmaları sonucu, çeşitli merkezlerde salgınlara neden olmuş bu suşlardan çoğunun aynı ya da benzer genotipik profile sahip oldukları ortaya konmuştur. 1995-2000 yılları arasında Kuzey İtalya'daki altı hastanede izole edilen, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli, çift disk sinerji testiyle

GSBL-pozitifliği saptanmış ve nozokomiyal salgın etkeni 44 *P. aeruginosa* suşundan 20 tanesinin PER-1 ürettiği belirlenmiştir (Pagani et al., 2004). Güney Kore’de bir hastanede, incelenen seftazidime dirençli 101 *P. aeruginosa* suşundan hiçbirinde PER-1 genine rastlanmamıştır (Yong et al., 2003).

PER-1 ve OXA-10 grubu enzim üreten izolatların klonal yakınlıklarını ve epidemiyolojik özelliklerini saptamak için yapılan çalışmalar arasında İstanbul Üniversitesi Hastanesi’nde PER-1 geni içeren 42 *P. aeruginosa* suşunun klonal yakınlığının ERIC-PZR ile araştırıldığı bir çalışmada 16 farklı bant paterni saptanmıştır (Aktaş et al., 2005). Bu suşlardan 25’inin (%60) iki farklı paternin üyesi olduğu anlaşılmış ve hastalar arasında klonal olarak ilişkili suşların yayıldığı sonucuna varılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’nde yürütülen bir çalışmada, PER-1 varlığı saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının ERIC-PZR yöntemiyle, büyük çoğunluğunun başlıca iki klonun üyesi oldukları anlaşılmıştır. Elde edilen veriler, PER-1 enzim prevalansının yüksek oluşundan büyük ölçüde klonal yayılım gösteren *P. aeruginosa* suşlarının sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Eraç, 2006). Bir başka çalışmada ise, Türkiye’de farklı bölgelerdeki yedi hastaneden rastgele seçilen birer *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının ERIC-PZR yöntemi ile klonal yakınlıkların incelenmesi sonucunda PER-1’in multi-klonal bir yayılım gösterdiği belirlenmiştir (Kolaylı ve ark., 2005).

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının klonal ilişkilerini saptamak için yaptığımız bu çalışmada; toplam 11 adet farklı bant paterni tespit edilmiş ve bu suşların başlıca dört klonun üyesi oldukları sonucuna varılmıştır. RAPD-PZR yöntemiyle Grup 1 (n:19), Grup 2 (n:7), Grup 3 (n:5), Grup 6 (n:6) ana klonların yanı sıra birkaç suş içeren alt gruplar belirlenmiştir. Bu verilere göre *P. aeruginosa* suşlarının 26’sının (%52) iki farklı paternin üyesi olduğu ve bu ana paternlerde yer alan suşların büyük çoğunluğunun üroloji ve erişkin yoğun bakım servislerindeki hastaların idrar ile kateter ve TAK örneklerinden izole edildikleri tespit edilmiştir. Hastanemizde PER-1 ve OXA-10 genleri prevalansının yüksek olmasının büyük ölçüde, klonal olarak ilişkili suşların hastalar arasındaki geçişlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

PFGE yöntemi, bakteriyel patojenler için kullanılan moleküler epidemiyolojik analizler arasında “altın standart” olarak kabul edilmektedir (Persing et al., 2004). PFGE diğer moleküler tekniklerde olduğu gibi bir infeksiyöz ajanın değişik izolatları arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Goering, 1998; 2000). Epidemiyolojik analiz için bakteri süşunun tanımlanmasına odaklanmak yerine bir seri bakteriyel izolatın tesadüfi olarak ya da kişiden kişiye geçişi üzerinde durulmaktadır. PFGE uygulamalarında diğer moleküler epidemiyolojik yöntemlerde olduğu gibi kromozomal benzerlikler karşılaştırılarak yorum yapılır (Goering, 2000). Bu bilgiler dikkate alınarak yapılan çalışmalarda incelenen süşların tiplendirilmesinde ve epidemiyolojik analizlerinin yapılmasında ERIC-PZR yanında PFGE tekniği de kullanılmaktadır.

İtalya’da farklı merkezlerde salgınlara neden olan PER-1 geni varlığı tespit edilen 9 *P. aeruginosa* süşunun genetik yakınlığının PFGE yöntemiyle araştırdığı çalışmada, bu süşlerden ikisinin aynı paterne sahipken, diğerlerinin farklı klonlara ait oldukları ve böylelikle de farklı salgınlara farklı klonlarca oluşturulduğu sonucuna varılmıştır (Pagani et al., 2004). İtalya’da yapılan diğer çalışmada, bir hastanenin yoğun bakım ünitesinde salgına yol açmış PER-1 geni içeren *P. aeruginosa* süşlerinin PFGE yöntemiyle klonal kaynaklı olduğu ve daha önce aynı hastanede sporadik olarak izole edilen PER-1 (+) *P. aeruginosa* süşleriyle benzerlik göstermedikleri belirlenmiştir (Luzzaro et al., 2001).

Çoklu ilaca dirençli ve duyarlı 38 adet *P. aeruginosa* izolatu ile yapılan çalışmada *SpeI* restriksiyon endonükleaz ile toplam 22 farklı pulsed-field jel profili elde etmişlerdir. Bu süşler içerisinde çoğul direnci olan 19 adet *P. aeruginosa* süşleri incelendiğinde, bu süşlerin büyük oranda genetik olarak ilişkili oldukları, 10 örnek içeren temel bir patern ile daha az sayıda örnek içeren 4 alt patern belirlemişlerdir. İnceledikleri çoğul dirençli süşler arasında epidemiyolojik olarak %80 oranında benzerlik tespit etmişlerdir (Thong et al., 2004).

İki farklı hastaneden izole edilen *P. aeruginosa* süşleri ile yaptıkları çalışmada; *DraI* restriksiyon enzimi ile gerçekleştirilen pulsed field jel elektroforezi sonucunda

toplam 84 farklı patern tespit etmişlerdir. Her iki hastanede de 14 izolatın bulunduğu ana patern ortak olarak saptanmıştır. Ayrıca bu gruptaki izolatların plazmit profili ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarının da her iki hastanede karşılaştırıldığında benzer olduğu belirlenmiştir (Nikbin et al., 2007).

55 adet *P. aeruginosa* izolatının genotipik ilişkisinin araştırıldığı PFGE çalışmasında; *XbaI* restriksiyon endonükleaz ile %96-%100 benzerlik gösteren ve 8 izolatın yer aldığı major bir patern saptanmıştır (Hla et al., 1996).

Kistik fibrozisli hastalarda, *P. aeruginosa* geçiş dinamiğinin incelendiği çok merkezli bir çalışmada, Londra'da dört farklı hastaneden izole edilen örnekler incelenerek hastalar ve hastaneler arası geçiş dinamikleri araştırılmıştır. *SpeI* restriksiyon enzimi ile gerçekleştirdikleri PFGE profillerinde dört ana patern saptamışlardır. İki farklı hastanede belirlenen iki ana genotip ortak olarak bulunmuş bu paternler arasında %80 benzerlik tespit edilmiştir (Scoot ve Pitt, 2004).

Seftazidim dirençli hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik ilişkilerinin derecelendirilmesini hedeflediğimiz çalışmamızda, farklı klinik servislerden ve çeşitli örnek türlerinden izole ettiğimiz suşların PFGE yöntemi ile *SpeI* restriksiyon enzimi kullanarak bant profilleri saptanmıştır. Bant profilleri yorumu ve izolatlar arasındaki genotipik ilişki Tenover kriterleri esas alınarak değerlendirilmiştir. Yapılan grup analizi sonucunda tüm izolatların dahil olduğu 11 farklı patern oluşturulmuştur. İzolatlar arasındaki epidemiyolojik benzerlik oranı %80 olarak belirlenmiş ve tek bir ana klon tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler hastanemizde saptanan beta-laktamaz enzim oranlarının yüksek oluşunun hastalar arasındaki geçişe bağlı olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen, seftazidim dirençli hastane infeksiyonu etkeni olan 50 adet *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik direncinde rol oynayan PER-1 ve OXA-10 grubu genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerini kodlayan gen bölgeleri araştırıldı.
2. Bu suşların antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için yapılan disk difüzyon testi sonuçlarına göre; seftazidime dirençli olan *P. aeruginosa* suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli ve incelenen ajanlar içerisinde en etkili olanların piperasilin-tazobaktam ile meropenem olduğu tespit edildi.
3. PZR yöntemi kullanılarak, spesifik primerlerle PER-1 ve OXA-10 grubu enzimlerin gen bölgeleri belirlendi. *P. aeruginosa* suşlarındaki PER-1 oranı %46, OXA-10 türevleri oranı %78, PER-1 ve OXA-10 türevleri birlikteliği ise %24 oranında bulundu.
4. PER-1 ve OXA-10 gen bölgeleri saptanan tüm suşlarda seftazidim MİK değerinin 64 µg/ml ve üzerinde olması PER-1 ve OXA-10 grubu enzimlerin seftazidime karşı yüksek etkinliğinin olduğu sonucunu destekledi.
5. İEO tekniği ile bir izolatın içerdiği tüm beta-laktamazları aynı anda saptamak teorik olarak mümkünse de, TEM-1 gibi sık rastlanan bir enzimin izoelektrik noktasının PER-1 ile çok yakın oluşu ayrıca PER-1 ve PER-2'nin izoelektrik noktalarının aynı olması bu tekniğin tarama testi olarak tek başına kullanımını sınırlamaktadır. Aynı şekilde çift disk sinerji testiyle de GSBL paterni saptanması PER-1 ve OXA-10 beta-laktamazların tanımlanmalarında yeterli ve güvenilir değildir. Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının yalnızca %64'ünde çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliğinin saptanmış olması bu bulguları destekler nitelikte bulundu.

6. Çalışmamızın diğer bir aşamasında; PER-1 ve OXA-10 grubu beta-laktamazların tipleri restriksiyon analizi ile belirlendi. PER gen bölgesi içeren izolatların tamamında PER-1 tipi, OXA-10 gen bölgesi saptanan izolatlarda ise seftazidim direncinden sorumlu tutulan OXA-11,-14,-16 tipleri tanımlandı.
7. İzolatların klonal yakınlıklarını tespit ettiğimiz RAPD-PZR sonuçlarına göre; suşların %52'sini içeren endemik iki büyük klonun saptanması ve bu gruplardaki suşların örnek türleri ile izole edildikleri servislerin benzer oluşu hastanemizdeki yüksek enzim prevalansının muhtemel göstergesi olarak değerlendirildi.
8. Epidemiyolojik analizde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemiyle elde ettiğimiz sonuçlar da RAPD-PZR sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Bu verilere göre iki büyük klon saptanmıştır ve aynı grupta yer alan birçok suşun klonal ilişkili oluşu izolatlar arasında geçiş olabileceğini gösterdi.
9. Çalışmamızda elde edilen sonuçların devamı olarak; GSBL paterninden sorumlu olduğu düşünülen enzimleri saptamak amacıyla, PER-1 üreten suşlarda sınıf 1 integron varlığının PZR ile araştırılması ve yeni beta-laktamaz enzimlerinin tanımlanması için DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların faydalı olacağını düşündürdü.

Çalışmada kullanılan PZR temelli teknikler ile PFGE gibi çeşitli moleküler tiplendirme yöntemlerinin, hastane infeksiyonlarına neden olan etkenlerin epidemiyolojik yönden araştırılmasında temel yöntemler olması açısından; moleküler direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına, tedavide başarısızlıkla sonuçlanan infeksiyonlar için kontrol önlemlerinin oluşturulmasına ve tedavi süreçlerinin düzenlemesine hızlı ve güvenilir bir şekilde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akçay SŞ, Topkaya A, Oğuzoğlu N (2003). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. *İnfek Derg.* **17**, 465-469.
- Aksaray S, Dokuzoğuz B, Günever E, Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Çalangu S, Günaydın M, Leblebicioğlu H, Esen S, Bayar B, Willke A, Fındık D, Tuncer I, Baysal B, Günseren F, Mamikoğlu L (2000). Surveillance of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* **45**, 695-699.
- Aktaş Z, Poirel L, Şalcıoğlu M, Özcan PE, Midilli K, Bal Ç, Anğ Ö, Nordmann P (2005). PER-1 and OXA-10 like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect.* **11**, 193-198.
- Alp E ve Doğanay M (2003). Monobaktam Antibiyotikler. *Antibiyotikler*. Editör(ler): Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 287-292.
- Andrei A and Zervos MJ (2006). The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med.* **130**, 662-668.
- Arbeit RD (1995). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology. Sixth Edition*, Eds: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. ASM pres Washington D.C. 190-208.
- Arman D ve Uçan E.S. (2004). Hastane kökenli pnömonide antibiyotik tedavisi. *Hastane kökenli pnömoni ve tedavisi (çeviri)*. **Birinci Baskı**. Editör(ler), Arman D, Uçan E.S. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 61-71.
- Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R, (2000). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. *Hastane İnfek Derg.* **4**, 92-96.
- Bahar G, Eraç B, Mert A, Gülay Z (2004). PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. *J Chemother.* **16**, 343-346.
- Bakır M. (2002). Hastane infeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram-negatif basiller: Tedavide karşılaşılan güçlükler ve çözüm önerileri. *Flora.* **7**, 142-156.
- Baron EJ. and Finegold SM. (1990). *Diagnostic Microbiology*. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 148-386.
- Bauerfeind A, Stemplinger R, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalın E, Anğ Ö, Bal Ç, Casellas JM (1996). Characterization of  $\beta$ -lactamase *bla<sub>PER-2</sub>*, which encodes

- an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 616-620.
- Bayramoğlu G (2004). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Meropenem Duyarlılıklarının Değişik Yöntemlerle Araştırılması. Samsun. Uzmanlık Tezi.
- Bergogne-Bérézın E (1999). Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs.* **58**, 51-67.
- Bilgehan H (1995). *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Barış Yayınevi, 161-172.
- Bilgehan H (2000). Non-fermentatif Gram olumsuz Basiller. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Onuncu Baskı*, İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi; 175-197.
- Bilgehan H (2002). Fermentasyon yapmayan Gram olumsuz bakteriler. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Üçüncü Baskı*. İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi; 464-475.
- Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J (2000). OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 1556-1561.
- Bradford PA (2001). Extended spectrum beta lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; **14**, 933-951.
- Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KV, Wilson SE, Quinn JP (1999). Carbapenems in clinical practise: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents.* **11**, 93-100.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA (1998). *Medical Microbiology*. Stamford: **Twenty-first Ed.**, 231-236.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA (2001). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, **Twenty-second Ed.**, 231-236. Appleton & Lange, 229-234.
- Brown S, Young HK, Amyes SGB (2005). Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect.* **11**, 15-23.
- Bush K, Jacoby GA, Mederios AA (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; **39**, 1211-1233.
- Bush K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Diseases*, **32**, 1085-1089.

- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**, 1379-1382.
- Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M (2006). Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 (beta)-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* **57**, 975-978.
- Chambers HF (2000). Penicillins. *Principles and Practise of Infectious Diseases. Fifth Ed.*, Mandell GR, Bennett JE, Dolin R. New York, Churchill-Livingstone Inc. 261-274.
- Clinical and Laboratory Standarts Institue (2006). *Performance standarda for antimicrobial susceptibilty testing Sixteenth Informational Supplement.* CLSI document M100-S16, Pennsylvania.
- Colin D, Louis D, Bernillon J, Guinand M, Wallache J, Las A (1997). Alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS Immun Med Microbiol.* **18**, 175-184.
- Corinne C, Herbert R, Herbert H (2001). Real-Time PCR and melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agenst Chemother.* **45**, 1730-1736.
- Çelik N (2007). Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta-laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. İstanbul. Doktora Tezi.
- Çıragil P., Söyletir G., Şener B., Erturan Z. (2002). Kistik fibrozis ve diğer alt solunum yolu infeksiyonlarında izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşiti antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 197-202.
- Çolak D (1999). Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Ankara Güneş Kitabevi. 81-89.
- D'Agata EM, Thayer V, Schaffner W (2000). An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **21**, 588-91.
- Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. (1995). Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob Chemother.* **35**, 281-294.
- Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. (1997). OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**, 785-790.

- Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM (1998). OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**, 3117-3122.
- Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**, 1362-1366.
- Danel F, Frere JM, Livermore DM. (2001). Evidence of dimersation among class D-beta-lactamases: kinetics of OXA-14 beta-lactamase. *Bichim Biophys Acta.* **1546**, 132-142.
- De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, Plaidy A, Boyer M, Carroy E, Gbadamassi MC, Lалуque O, Poupert MC, Villemain M, Sirot J (2004). Frequency and diversity of Class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother.* **54**, 634-639.
- De La Puente-Redondo VA, Del Blanco NG, Gutierrez-Martin CB, Garcia-Pena FJ, Ferri EFR (2000). Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J Clin Microbiol.* **38**, 1016-1022.
- Delden CV and Iglewski BH (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* **4**, 551-560.
- De Man P, Van D V, Leemreijze M, Van Leeuwen W, Vos G, Van Den Anker J, Verbrugh H, Van Belkum A (2001). Enterobacter species in a pediatric hospital: horizontal transfer or selection in individual patients? *J Infect Dis.* **184**, 211-214.
- Denton M and Wilcox MH (1997). Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* **40**, 468-474.
- Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM (2001). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis.* **7**, 910-911.
- Doig P, Paranchych W, Sastry PA, Irvin RT (1989). Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity. *Can J Microbiol.* **35**, 1141-1145.
- Durmaz B ve Ağel HE (2001). *Pseudomonas aeruginosa*'da beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve direnç fenotipleri. *Hastane İnfek Derg.* **5**, 17-20.
- Durmaz R. (2001). Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. İkinci Baskı*, Editör, Durmaz R, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 139-147.

- Durupınar B (2001). Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergisi*. **14**, 47-56.
- Eldere JV (2003). Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother*. **51**, 347-352.
- Eraç B. ve Gülay Z. (2003). Prevalance and molecular epidemiology of PER-1 beta-lactamase in Gram-negative bacteria. *13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Glasgow/UK, Abstract Book
- Eraç B (2006). Hastane Kökenli Gram-Negatif Bakterilerde PER-1 Enziminin Moleküler Epidemiyolojisi. İzmir. Doktora Tezi
- Erdem B (1999). Pseudomonaslar. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (çeviri). Editör(ler), Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Ankara: Güneş Kitabevi: 733-738.
- Eskitürk A, Ener B, Quint W (1997). Nötropenik hastaların tekrarlayan orofaringeal kandidaz ataklarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının genotipik analizi. *Flora*. **2**, 16-20.
- Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N (2005). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg*. **19**, 68-70.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. (2002). *Pseudomonas, Burkholderia, and similar organisms*. *Bailey/Scott's Diagnostic Microbiology*. **Eleventh Ed.**, Mosby. 385-398.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM (1998). CDC definitins for nosocomial infections. *Am J Infect Control*. **16**, 128-140.
- Giamarellou H and Antoniadou A (2001). Antibiotic therapy. Antipseudomonal antibiotics. *Med Clin North America*. **85**, 19-42.
- Giamarellou H (2002). Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother*. **49**, 229-233.
- Goering RV (1998). The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation. In: *Rapid Detection of Infectious Agents*. Eds, Specter S, Bendinelli M, Friedman H. Plenum press, New York. 131-157.
- Goering RV (2000). The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Rev Med Microbiol*. **11**, 145-152.
- Gülay Z, Taşkıran Aİ, Kaplan O, Saylak MÖ (2001). Beta laktamazlar. *DEU Tıp Fak Derg*. **12**, 343-358.

- Gülay Z (2002). Kinolon Direnci. *Flora*. **7**, 225-232.
- Gülay Z (2003). Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. *Hastane İnfeksiyonları*. **Birinci Baskı**, Editör(ler): Yüce A, Çakır N. İzmir, 87-120.
- Gülay Z (2003). Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyaller. *Ankem Dergisi*. **17**, 192-204.
- Gülay Z (2004). İndüklenebilir beta-laktamazlar. In: *Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları*, **Birinci Baskı**, Eds, Ulusoy S, Lelebicioğlu H, Arman D. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 95-110.
- Gündüz T, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, Algün Ü, Özbakkaloğlu B (2003). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının isepamisin ve amiikasine duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **33**, 232-235.
- Güner SK (2003). *Pseudomonas aeruginosa*'da porin direncinin saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.
- Gür D (1997). Beta Laktamazlar. *Flora*. **3**, 3-18.
- Gür D (2003). Protein sentezini etkileyen antibakteriyeller. *Ankem Dergisi*. **17**, 205-207.
- Gür D (2004). Gram-negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. In: *Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları*, **Birinci Baskı** Editör(ler): Ulusoy S, Lelebicioğlu H, Arman D. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 69-83.
- Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Aklın HE. (1993). OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; **37**, 1637-1644.
- Hanberger H, Rodrigez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ (1999). Antibiotic susceptibility among aerobic Gram-negative bacilli in intensive care units in 5. European countries. *JAMA*. **281**, 67-71.
- Haris A, Viera CT, Venkatamaran L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y (1999). Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. **28**, 1128-1133.
- Hla SW, Kok PH, Tan WC, Ho B (1996). Genome macrorestriction analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bronchiectasis patient without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. **34**, 575-578.
- Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG (1992). CDC definitions of nosocomial surgical site infections: a modification of CDC surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **13**, 606-608.

<http://www.biomarker.cdc.go.kr>

<http://www.biomarker.cdc.go.kr/pseudomonasaeruginosa>

Jones RN, Sader HS, Beach ML (2003). Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *Inter J Antimicrob Agents*. **22**, 551-556.

Karadenizli A ve Vahaboğlu H. (2004). Antibiyotik direnci ve klinik yansıması. *Hastane kökenli pnömoni ve tedavisi (çeviri)*. **Birinci Baskı**, Editör(ler), Arman D, Uçan E.S. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 73-92.

Kıska DL. and Gilligan PH. (2003). Pseudomonas. *Manual of Clinical Microbiology*. **Eight Ed.**, In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. ASM press; 719-728.

Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Saniç A, Vahaboğlu H (2005). PER-1 still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *FEMS Microbiol Lett*. **249**, 241-245.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997). The nonfermentative Gram-negative bacilli. *Color Atlas and Textbook of Clinical Microbiology*. **Fifteenth Ed.**, Philadelphia: Lippincott: 253-309.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997). *Color Atlas and Textbook of Clinical Microbiology*. **Fifteenth Ed.**, Philadelphia: Lippincott Raven Publishers: 785-856.

Köksal F (1999). Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. *Hastane İnfek Derg*. **3**, 189-195.

Kuruüzüm Z (2003). Dirençli Gram olumsuz nonfermentatif bakteri infeksiyonları ve sağaltımı. *Hastane İnfeksiyonları*. Editör(ler): Yüce A, Çakır N. **Birinci Baskı**. İzmir Güven Kitabevi. 73-78.

Leblebicioğlu H, Günaydın M, Esen Ş, Tuncer I, Fındık D, Ural O, Saltoslu N, Yaman A, Taşova Y (2002). Surveillance of antimicrobial resistance in Gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: analysis of data from the last 5 years. *J of Chemother*. **14**, 140-146.

Leblebicioğlu H (2003). Parenteral sefalosporinler. *Antibiyotikler*. Editör(ler): Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 253-266.

Livermore DM (1995).  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. **8**, 557-584.

- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP (2001). Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* **48** (1), 87-102.
- Livermore DM (2002). Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* **34**, 634-640.
- Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A (2001). Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Clin. Microbiol.* **39**, 1865-1870.
- May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, Devault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Misra TK, Chakrabarty AM (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev.* **4**, 191-206.
- Mc Gowan J EJ (2001). Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* **7**, 286-292.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. (2002). *Pseudomonas* and related organisms. *Med Microbiol.* **Fourth Ed.**, Mosby, 297-304.
- Nikbin VS, Abdi-Ali A, Feizabadi MM, Gharavi S (2007). Pulsed field electrophoresis & plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. *Indian J Med Res.* 146-151.
- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol.* **183**, 1047-1057.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R (1993). Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**, 962-969.
- Nordmann P ve Naas T (1994). Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with classA  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**, 104-114.
- Nordmann P ve Poirel L (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* **8**, 321-331.
- Oh E-J, Seungok L, Park Y-J (2003). Prevalance of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J Microbiol Methods.* **54**, 411-418.
- Olive DM and Bean P (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing microorganims. *J Clin Microbiol.* **37**, 1661-9.



- Otkun M (1998). Diğer Enterik bakteriler ve *Pseudomonas* türleri. In: *Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları*, Editör(ler), Serter D, Ertem E, Gökengin D. İzmir: Nobel Tıp Kitapevi. 253-263.
- Öncül O. (2004). Hastane kökenli Gram-negatif çomaklarda direnç. *XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Kuşadası, Aydın, Kongre Kitabı, S 94.
- Öngen B (2003). Hastanede sorun olan mikroorganizmalar: Gram-negatif bakteriler. In: *3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı*. Samsun, Editör(ler): Günaydın M, Sünbül M. 393-407.
- Över U, Gür D, Ünal S, Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Study Group (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* **7**, 470-478.
- Özguven V (2002). Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Patolojisi. Birinci Baskı*. Editör(ler): Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 192-202.
- Özsüt H ve Gün H (1998). Yoğun bakım ünitesinde infeksiyon sorunu: Dirençli bakteriler ve antibiyotik kullanımı. *Hastane İnfek Derg.* **1**, 5-14.
- Öztürk R (2002). Antiseptik ve dezenfektan maddelere karşı direnç sorunu. In: *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*, Editör(ler), Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. Samsun: Simad Yayınları **1**, 41-60.
- Özyurt M, Kısa Ö, Albay A, Başustaoğlu AC, Gün H (1998). Meropenemin hastane infeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına in vitro etkinliği. *Flora.* **3**, 178-182.
- Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM (2002). Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* **40**, 1549-1552.
- Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, Daturi R, Romero E, Rossolini GM (2004). Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* **42**, 2523-2529.
- Pechere JC and Köhler T (2000). Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* **5**, 15-18.
- Pereria M, Perilli M, Mantengoli E, Luzzaro F, Toniolo A, Rossolini GM, Amicosante G (2000). PER-1 extended-spectrum beta-lactamase production in an *Alcaligenes faecalis* clinical isolate resistant to extended-spectrum cephalosporins and monobactams from a hospital in Northern Italy. *Microb Drug Resist.* **6**, 85-90.

- Persing DH, Smith TF, Tenover FC, Thomas JW (1993). Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. ASM Washington D.C.
- Persing DH (2004). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Eds, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Palme Yayıncılık (2006), Ankara. **15**, 185-196.
- Pfaller MA and Herwaldt LA (1997). The clinical microbiology laboratory and infection conyrol: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis.* **25**, 858-70.
- Pfaller MA (2001). Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicality and costs. *Emerg Infect Dis.* **7**, 312-8.
- Piddock LJV and Turner HL (1992). Activity of meropenem against imipenem-resistant bacteria and selection in vitro of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **11**, 1186-1190.
- Pitt TL (1989). Lipopolysaccharide and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* **42**, 1-7.
- Pitt TL (1998). Pseudomonas, Burkholderia and related genera. In: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, **Nineth Ed**, Eds, Colllier L, Balows A, Susman M. London, Oxford University Press.
- Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 18-22.
- Poirel L, Cabanne L, Vahaboğlu H, Nordmann P (2005). Genetic environment and expression of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *bla<sub>PER-1</sub>* gene in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 1708-1713.
- Pollack M (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and Practise of Infectious Diseases*, **Fifth Ed**. Eds, Mandell GR, Bennett JE, Dolin R. New York, Churchill-Livingstone Inc.; 2310-2335.
- Que VJ and Woods DE (1987). Alteration of lung structure and function by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol Immunopathol Res.* **6**, 93-102.
- Quinn JP (1998). Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram negative pathogens. *Clin Infect Dis.* **27(1)**, 117-124.
- Ralp D and McClelland M (1998). Arbitrarily primed PCR methods for studying bacterial diseases. In: *Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular Bacterology: Protocols and Clinical Applications*. Eds, Woodford N, Johnson P. Humana Press Inc, Totowa, NJ. 60-75.

- Rice LB, Sahn D, Bonomo RA (2003). Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*, **Eighth Ed.**, Eds, Murray PH, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. Washington DC: ASM press; p. 1076-1102.
- Salyers AA and Witt DD (1994). *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. *ASM Press*, Washington, D.C. 260-270.
- Schultz DR and Müller KD (1974). Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement- derived and phagocytic factors. *Infect Immun.* **10**, 128-135.
- Schweizer HP (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Gen Mol Res.* **2**, 48-62.
- Scoot FW and Pitt TL (2004). Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol.* **53**, 609-615.
- Shah PM and Isaacs RD (2003). Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* **52**, 538-542.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* **19**, 512-530.
- Sirot D. (1995) Extended-spectrum plasmid mediated beta-lactamases. *J. Antimicrob Chemother.* **36**, 19-34.
- Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Bowen CPA (2000). Performance of phenotypic and genotypic methods determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol.* **38**, 2488-2493.
- Smith D, Willshaw G, Stanley J, Arnold C (2000). Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: Comparison of isolates to a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol.* **38**, 4616-4620.
- Sokol PA, Iglewski BH, Hager TA, Sadoff JC, Cross AS, Mc Manus A, Ferber BF, Iglewski WJ (1981). Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **34**, 147-153.
- Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Bakarat J, Hentzer M, Molin S, Kharazmi A, Hoiby N, Mathee K (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol.* **53**, 679-690.

- Stratton IV CW and Grene JN (2004). Role of the microbiology laboratory in hospital epidemiology and infection control. *Hospital Epidemiology and Infection Control*, **Third Ed.**, Ed, Mayhall CG. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1807-25.
- Struelens M (1999). Hospital Infection control. In: *Infectious Diseases*, Eds, Armstrong D, Cohen J, Berkley SF, et al. Mosby and Imprint of Harcourt Publishers Ltd. London. **10**, 1-14.
- Struelens M (2002). Molecular typing: a key tool for the surveillance and control of nosocomial infection. *Cur Opin Infect Dis*. **15**, 383-385.
- Swaminathan B and Matar GM (1993). Molecular typing methods. In: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Eds, Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. ASM Press, Washington D.C. 26-50.
- Şencan İ (2003). Dezenfektanlara direnç sorunu ve pratikte önemi. 3. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı*, Samsun. Editör(ler): Günaydın M, Sünbül M. 317-325.
- Tang Y-W, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, Li H, Cockerill FR 3rd, Thompson RL, Montgomery SO, Persing DH (2000). Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. **38**, 1347-1351.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. **33**, 2233-2239.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV (1997). Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America how to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **18**, 426-439.
- Thompson RCA. (2000) Molecular epidemiology: applications to problems of infectious disease. In *Mol Epidemiol Infect Dis*. Ed, Thompson RCA. London: Arnold;1-4.
- Thong KL, Lai KS, Ganeswari R, Puthucherry (2004). Pulsed-Field gel electrophoresis of multidrug-resistant and sensitive strains of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital. *J Infect Dis*. **57**, 206-209.

- Tompkins LC (1998). Molecular epidemiology in infectious diseases. In: *Infectious Diseases, Second Ed.*, Eds. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 28-35.
- Tuncer S ve Akova M (1997). *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları. *Flora*. **1**, 61-65.
- Turgut H, Turhanoğlu M, Çetin ÇB, Yalçın AN (2002). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfek Derg.* **16**, 63-66.
- Usluer G (2002). Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*. **7**, 135-141.
- Vahaboğlu H, Hall LM, Mulazımoğlu L, Dodanlı S, Yıldırım I, Livermore DM (1995). Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1  $\beta$ -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. *J Med Microbiol.* **43**, 294-299.
- Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioğlu H, Balık I, Aydın K, Otkun M (1997). Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**, 2265-2269.
- Vahaboğlu H, Sarıbaş S, Akbaş H, Öztürk R, Yücel A (1998). Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *J Antimicrob Chemother.* **42**, 269-270.
- Vahaboğlu H, Öztürk R, Akbal H, Sarıbaş S, Tansel Ö, Coşkun F (1998). Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol.* 827-829.
- Vahaboğlu H. (2000). Çoğul dirençli non-fermentatif Gram-negatif basiller. *Hastane İnfek Derg.* **4**, 222-225.
- Vahaboğlu H. ve Akhan SÇ. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* Türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Cilt 2, Editör(ler), Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M., İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1008-1024.
- Van Belkum A (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR: a literature review. *Clin Microbiol Rev.* 174-184.
- Van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A (1999). Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of novel epidemiology marker. *J Clin Microbiol.* **37**, 342-349.

- Versalovic J, Koeth T, Lupski JR (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* **19**, 6823-6831.
- Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro NF, Power P, Ingold E, Gadea P, Sirok A, Schelotto F, Ayala JA, Gutkind G (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol.* **43**, 2940-2943.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P (2003). Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 2385-2392.
- White RL, Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J (1996). Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 904-908.
- Wilson MP and Spencer RC (1999). Laboratory role in the management of hospital acquired infections. *J Hosp Infect.* **42**, 1-6.
- Woods DE and Sokol PA (1985). Use of transposon mutants to assess the role of exoenzyme S in chronic pulmonary disease due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol.* **4**, 163-169.
- Woods DE, Sokol PA, Bryan LE, Storey DG, Mattingly SJ, Vogel HJ, Ceri H (1991) . In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis.* **163**, 143-149.
- Wozniak DJ, Wyckoff TJA, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsel MR (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceed Nation Acad Scien.* **100**, 7907-7912.
- Wretling B and Paulovskis OR (1983). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infection. *Rev Infect Dis.* **5**, 998-1004.
- Yağcı A, Tunç Y, Söyletir G (2002). Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comparison of two procedures. *New Microbiol.* **25**, 223-229.
- Yamamoto S (2007). *Molecular epidemiology of uropathogenic Escherichia coli.* *J Infect Chemother.* **13**(2), 68-73.
- Yao JDC and Moellering RC (2003). Antibacterial Agents. In: *Manual of Clinical Microbiology. Eighth Ed.*, Eds, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. ASM press. 1039-1073.

Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A (2003). High prevalence of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 1749-1751.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Ankara'da doğdu. 1996 yılında İskilip Lisesi'nden mezun oldu. 1997-2001 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans eğitimini tamamladı. 2002 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. 2006 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı.