

**T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

HARRAN ÜNİVERSİTESİ ARA TIRMA VE UYGULAMA
HASTANESİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA ZOLE
DİKLİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ZOLATLARINDA
ANTİBİYOTİK DİRENÇ, ENDÜKLENEBİLİR BETALAKTAMAZ VE
METALLO BETALAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hadice Özçınar

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR

ANLIURFA

2013

**T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

HARRAN ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA
HASTANESİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA ZOLE
DİKENLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ZOLATLARINDA
ANTİBİYOTİK DİRENÇ, İNDÜKLENEBİLİR BETALAKTAMAZ VE
METALLO BETALAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hadice Özçınar

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından
26.12.2012 tarih ve 12205 protokol numarası ile desteklenmiştir.

ANLIURFA

2013

TE EKKÜR

Tez konumun seçilmesinden, çalı maların yürütülmesine kadar her a amada ilgi ve deste inden yararlandı ım de erli danı man hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR' a en içten duygularıyla te ekkür ederim. Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalı tı ım süre içerisinde sürekli desteklerini gördü üm ve bize her zaman örnek hocalarım Sayın Prof. Dr. Sami TA ÇI ve Sayın Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK' e te ekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık e itimim boyunca birlikte uyumlu bir çalı ma ortamı sa layarak her konuda bana destek olan arkada larım Uzm. Dr. Seray TÜMER' e, Dr. İhan ÜNER' e, Dr. Özge Alkan B L K' e ve özellikle çalı mamın istatistiksel analizinde yardımcı olan Dr. Ay e Nuriye VARI LI' ya, tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalı anlarına, tez çalı mam süresince yardımlarını gördü üm Esmâ CEYLAN, Cemile GÜNBE , Necmettin YILDIZTEK N, Ali KÜÇÜK, yazı i lerimde yardımcı olan Murat ALKAN ve Tevrat ZERAY' a te ekkür ederim.

Çalı mamın her a amasında ve en zor durumlarda bana destek olan, sabır gösteren e im Lütfü ÖZÇINAR' a, biricik kızım DUHA' ya, çalı malarım süresince desteklerini esirgemeyen, kızımın her türlü nazını çeken Emine ANNES NE' e ve aileme sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

Dr. Hadice Özçınar

Ç NDEK LER	SAYFA NO
TE EKKÜR	I
Ç NDEK LER	II
TABLolar D Z N	V
EK LLER VE RES MLER D Z N	VI
KISALTMALAR D Z N	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. G R VE AMAÇ	1
2. GENEL B LG LER	2
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2.1.1. Mikrobiyoloji	3
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi	5
2.1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virulans Faktörleri	5
2.1.4.1. Flagella	5
2.1.4.2. Pili (Fimbria)	5
2.1.4.3. Lipopolisakkarit	6
2.1.4.4. Aljinat	6
2.1.4.5. Biyofilm Olu umu	6
2.1.4.6. Quorum-Sensing (Ço unlu u Algılama)	7
2.1.4.7. Elastaz	8
2.1.4.8. Alkalın Proteaz	8
2.1.4.9. Piyosiyenin	8
2.1.4.10. Piyoverdin	8
2.1.4.11. Fosfolipaz C	9

2.1.4.12. Ramnolipid	9
2.1.4.13. Ekzotoksin A	9
2.1.4.14. Ekzoenzim S ve T	9
2.1.4.15. Lökosidin	10
2.1.4.16. Enterotoksin	10
2.2. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonları	10
2.2.1. Solunum Sistemi enfeksiyonları	10
2.2.2. Bakteriyemi	11
2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi enfeksiyonları	11
2.2.4. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	11
2.3. Laboratuvar Tanısı	12
2.4. Tedavi	12
2.4.1. Beta-laktam Antibiyotikler	13
2.4.1.1. Penisilinler	13
2.4.1.2. Sefalosporinler	14
2.4.1.3. Monobaktamlar	14
2.4.1.4. Karbapenemler	14
2.4.1.5. Betalaktamaz inhibitörleri	15
2.4.2. Aminoglikozitler	15
2.4.3. Kinolonlar	16
2.5. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	16
2.5.1. Aktif Dış Pompaya (Efluks) Sistemi	16
2.5.2. Dış Membran Porin Defektleri	17
2.5.3. Aminoglikozid Direnci	18
2.5.4. Kinolon Direnci	19
2.5.5. Betalaktamazlar	19
2.5.5.1. Kromozomal AmpC Tipi Betalaktamaz Enzimleri (İndüklenebilir Betalaktamazlar - BL)	22

2.5.5.2. Karbenisilini Hidrolize Eden Betalaktamazlar	24
2.5.5.3. Geni lemi Spektrumlu Betalaktamazlar	26
2.5.5.4. Plazmid Kaynaklı AmpC Betalaktamazlar	29
2.5.5.5. Karbapenemazlar	29
2.5.5.5.1. Metallobetalaktamazlar	30
2.6. ndüklenebilir Betalaktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri	33
2.6.1. Disk ndüksiyon Yöntemi	33
2.6.2. ndükleyici Ajanın Besiyerine Eklenmesi	34
2.7. Metallobetalaktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri	34
2.7.1 Modifiye Hodge Testi	34
2.7.2. Çift Disk Sinerji Testleri	35
2.7.3. Kombine Disk Testi	36
2.7.4. MBL E Test Yöntemi	36
2.7.5. Moleküler Yöntemler	36
3. Materyal ve Metod	37
4. Bulgular	40
4.1. Epidemiyolojik Bilgiler	40
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	42
4.3. Disk ndüksiyon Testi Sonuçları	46
4.4. MBL E Test, Kombine Disk Testi ve Modifiye Hodge Testi Sonuçları	46
5. Tartı ma	53
6. Sonuç	62
Kaynaklar	63

TABLolar D Z N

Tablo 1. Tıbbi yönden önemli Pseudomonasların sınıflandırılması	2
Tablo 2. <i>P. aeruginosa</i> ' da bulunan efluks pompa sistemleri	18
Tablo 3. Beta-laktamaz grupları ve genel zellikleri	25
Tablo 4. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunan MBL enzimleri	33
Tablo 5. <i>P.aeruginosa</i> 'nın izole edildi i klinik örneklerin da ılımı	40
Tablo 6. <i>P. aeruginosa</i> su larının izole edildi i hastaların ya aralı ı	42
Tablo 7. 100 <i>P. aeruginosa</i> izolatının antimikrobiyallere duyarlılı ı	43
Tablo 8. Karbapenemlere dirençli 9 <i>P. aeruginosa</i> izolatının örnek tipine göre da ılımı	44
Tablo 9. Karbapenemlere dirençli 9 <i>P. aeruginosa</i> izolatının kliniklere göre da ılımı	45
Tablo 10. Karbapenemlere dirençli 9 <i>P. aeruginosa</i> izolatının karbapenem di ı antibiyotiklere duyarlılı ı	45
Tablo 11. MBL E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki <i>P. aeruginosa</i> izolatının test sonuçları	48
Tablo 12. Karbapenemlere dirençli 9 <i>P. aeruginosa</i> izolatında ve standart su ta fenotipik testlerle MBL tespit sonuçları	51
Tablo 13. E test Kombine disk teti ile MBL pozitif bulunan iki <i>P. aeruginosa</i> izolatının di er antibiyotiklere duyarlılı ı	52

EK LLER VE RES MLER D Z N

ekil 1. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının izole edildi i kliniklere göre da ılımı	41
Resim 1. BL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatu	46
Resim 2. BL negatif <i>P. aeruginosa</i> izolatu	47
Resim 3. MBL E testi ile MBL pozitifli i	47
Resim 4. MBL E testi ile MBL pozitifli i	48
Resim 5. Kombine disk testi ile MBL pozitifli i	49
Resim 6. Kombine disk testi ile MBL negatifli i	49
Resim 7. Modifiye Hodge testi ile MBL pozitifli i	50
Resim 8. Modifiye Hodge testi ile MBL negatifli i	50

KISALTMALAR

- CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute
- EARSS** : European Antimicrobial Resistance Surveillance System
- EDTA** : Etilendiaminotetraasetik Asit
- GSBL** : Geni lemi Spektrumlu Betalaktamaz
- IP/IPI** : mipenem/ mipenem+ Etilendiaminotetraasetik Asit
- BL** : ndüklenebilir Betalaktamaz
- MBL** : Metallobetalaktamaz
- MDR** : Multi Drug Resistance
- MHA** : Mueller-Hinton Agar
- SMA** : Sodyummerkaptoasetik Asit
- GES** : Guiana Extended Spectrum
- VIM** : Veronese mipenemase
- SPM** : Sao Paulo MBL
- GIM** : German mipenemase
- KPC** : Karbapenemaz
- OXA** : Oksasilinaz
- PSE** : Pseudomonas Spesifik Enzim

ÖZET

HARRAN ÜNİVERSİTESİ ARA TIRMA VE UYGULAMA HASTANESİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA ZOLEDEMLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ, İNDÜKLENEBİLİR BETALAKTAMAZ VE METALLO BETALAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ

Dr. Hadice ÖZÇINAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç göstermesi; tedavide zorluklara, maliyet artışına, morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenle erken ve etkin antibiyotiklerle tedaviye başlanması önem taşımaktadır.

Çalışmamızda *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnç, indüklenebilir betalaktamaz (BL) ve metallo betalaktamaz (MBL) oranları belirlenerek; *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında ampirik tedavi seçeneklerine, uygunsuz antibiyotik kullanımının engellenmesine ve etkin tedavi yaklaşımlarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan 2009-2013 tarihleri arasındaki dört yıllık süre içerisinde Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *P. aeruginosa* izolatı konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış, antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2013) standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Karbapenem direncini doğrulamak için imipenem ve meropenem E test kullanılmıştır. BL üretimini belirlemek için disk indüksiyon yöntemi kullanılmıştır. MBL üretimini belirlemek için Modifiye Hodge testi, imipenem/EDTA Kombine Disk testi, MBL E test kullanılarak sonuçları karıştırılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testinde betalaktam antibiyotiklerden en az direnç seftazidimde belirlenirken kolistine direnç saptanmamıştır. Çoklu ilaç direnci ise %8 olarak belirlenmiştir. Çoklu ilaç dirençli bu 8 izolatın 2'sinde MBL enzim üretimi belirlenmiştir. MBL enzim üretiminin çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerde daha yüksek olduğu görülmüştür.

Disk indüksiyon yöntemi ile izolatların %86' sında BL üretimi saptanmıştır. BL oranını yüksek olarak belirlediğimiz çalışmamızın sonucunda; seftazidim, sefepim veya piperasilin/tazobaktamın gibi antibiyotiklerin ampirik tedavide duyarlı olmasına rağmen bakterilerine kullanılması BL üretimini indükleyecek ender antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının, hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisi için doğru bir yaklaşım olacağını düşündürmüştür. Yine *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç geliştirebileceğinden; bu izolatların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması ve bu konuda klinisyenlerin bilgilendirilmesinin uygun olacaktır düşünülmüştür.

BL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının çoğunun ve karbapenem dirençli izolatların çoğunun yeşil renkli pigment ürettiği tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar *P. aeruginosa* antibiyotik direnci ile pigment rengi arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının %22.2' sinde MBL üretimi tespit edilmiştir. Tüm izolatlar içinde MBL pozitif olanların oranı %2 olarak belirlenmiştir. CLSI' da MBL üretimini saptamak için önerilen standart bir test bulunmamaktadır. Çalışmamızda; IMP/EDTA Kombine Disk testi IP/IPI E test ile aynı izolatlarda ve aynı oranda MBL üretimi belirlenmiştir. Kombine Disk testinin, E test kadar güvenli, hızlı ve kolay yorumlanabilen ayrıca E teste göre maliyet yönünden çok daha uygun bir test olduğu düşünülmüştür. Rutin laboratuvarlarda karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında IMP/EDTA Kombine Disk testinin yapılmasının; MBL pozitif izolatların hızla saptanmasına ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkin olarak uygulanmasına katkıda bulunacaktır düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotik duyarlılığı, indüklenebilir betalaktamaz, metallobetalaktamaz.

ABSTRACT

DETERMINATION RATES OF ANTIBIOTIC RESISTANCE, INDUCIBLE BETALACTAMASE AND METALLO BETALACTAMASE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED IN MIKROBIYOLOGY LABORATORY OF RESEARCH AND APPLICATION HOSPITAL HARRAN UNIVERSTY

Hadice ÖZÇINAR, MD

Specialty Tesis, Department of Medical Microbiology

Pseudomonas aeruginosa is one of the important nosocomial infections. Increasing resistance to antimicrobial agents and rising costs have caused an increase in morbidity and mortality and in treatment difficulties. Therefore, early initiation of correct effective antibiotic is important in treatment and prevention of serious complications.

In our study, rates of antibiotic resistance, inducible betalactamase (IBL) and metallo betalactamase (MBL) were determined in *P. aeruginosa* isolates in order to contribute to the prevention of inappropriate use of antibiotics, effective treatment, an increase in empiric treatment options and achievement of an efficient treatment.

Throughout a period of four years, 2009-2013, 100 *P. aeruginosa* isolates were isolated from various clinical specimens from Research and Application Hospital patients and identified in Microbiology laboratory by conventional methods. Antibiotic susceptibility was performed using CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute 2013). Kirby-Bauer disk diffusion method was used. Carbapenem resistance to imipenem and meropenem was verified by the E test. Disk induction method was used to determine the IBL production while Modified Hodge test, MBL E test and combined imipenem / EDTA disk were used to determine the production of MBL.

In antibiotic susceptibility, among beta lactam antibiotics the least resistance was seen against ceftazidime. All strains were uniformly sensitive to colistin. Multi-drug resistance was observed in 8% of isolates. Eight percent of the isolates were resistant to at least three antipseudomonal drugs group (MDR), of which two isolates were positive for MBL enzyme production. The rate of MBL enzyme production was higher in multidrug-resistant isolates than others.

IBL production was detected in 86% of the isolates with disk induction method. IBL rates was at a high production as a result of our study. Although *P. aeruginosa* are sensitive to antibiotics such as ceftazidime, cefepime, or piperacillin/tazobactam such drugs alone induce production of IBL therefore combination with other antipseudomonal drugs used was thought to be the right approach for the empirical treatment of hospital infections. Again, antimicrobial drug resistance may arise during treatment of *P. aeruginosa* infections. It is appropriate to repeat antibiograms 3-4 days post therapy treatment.

The mostly IBL producing *P. aeruginosa* strains and the most Carbapenem-resistant isolates were found to have a green exopigment. These results suggest a possible relationship between antibiotic resistance and the pigment color of *P. aeruginosa*.

MBL producing isolates were positive at the rate of 22.2% among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates. This rate was 2% among all studied *P. aeruginosa* isolates. There is no standard test to determine MBL production proposed by CLSI. IMP/EDTA Combined Disk test and IP/IPI E test were found to be at the same rate in our study. IMP/EDTA Combined Disk test was fast, easily read, interpreted and even more cheaper compared to IP/IPI E test. So this test is thought to be much more affordable in terms of cost and productivity. In routine laboratorys, carbapenem-resistant *P. aeruginosa* determination by IMP/EDTA Combined Disk test can provide rapid detection and effective implementation of infection control measures.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic susceptibility, inducible beta-lactamases, metallobeta-lactamase.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastane infeksiyonları morbidite ve mortalite oranlarının yüksekliği ile beraber ekonomik maliyeti nedeni ile tüm dünyada önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (1). *Pseudomonas* türleri primer olarak nozokomiyal infeksiyonlara yol açan fırsatçı nonfermentatif gram negatif patojenlerdir (5).

Türkiye’ de hastane enfeksiyonları etkenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*’nın, gram negatif etkenler içinde %25.8-%56, tüm hastane infeksiyonlarının ise %10’unda etken olduğu bildirilmektedir (3, 4).

Çalışmamızda hastanemizdeki *P. aeruginosa* izolatlarının, direnç profilinin, indüklenebilir betalaktamaz ve metallobetalaktamaz oranlarının belirlenmesi ile özellikle uygunsuz antibiyotik kullanımı nedeniyle çoklu direnç gösteren kökenlerin giderek artışının önlenmesine, infeksiyonlarının daha hızlı etkin tedavi edilmesine ve uygunsuz antibiyotik kullanımının engellenmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu amaçla Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnç, indüklenebilir betalaktamaz ve metallobetalaktamaz oranları belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa, Pseudomonadaceae ailesinde Pseudomonas cinsinde yer alır. Pseudomonas cinsinde bulunan bakteriler rRNA homolojilerine göre, beş gruba ayrılmıştır. Son yıllarda yapılan ayrıntılı çalışmalara göre yeniden sınıflandırılmıştır (6).

P. aeruginosa, *P. fluorescens*, *P. putida*, floresan veren grupta; *P. stutzeri*, *P. mendocina* floresan vermeyen grupta yer alır (39).

Tablo 1. Tıbbi önemi olan pseudomonasların sınıflandırılması (39,179).

rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu	Cins ve Tür
I Fluoresan Grubu Non Fluoresan Grubu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i>
II	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Ralstonia pickettii</i>
III	Comamonas türleri Acidovorax türleri Delftia türleri Hydrogenophoga türleri
IV	Brevundimonas türleri
V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Xanthomonas türleri

2.1.1. Mikrobiyoloji

P. aeruginosa, kanlı agarda 3-5 mm büyüklüğünde kenarları düzensiz, üzeri düz, β-hemolitik koloniler oluşturur. Kolonilerin kendine özgü, üzüm benzeyen tipik bir kokusu vardır (6, 9). Triptofan 2-aminoasetofenon üretiminden kaynaklanan karakteristik üzüm kokusu *P. aeruginosa*'yı ayırt etmede kullanılır (12). Pseudomonadaceae ailesi içindeki en patojen tür olan *P. aeruginosa* gram negatif, sporsuz, düz veya hafif kıvrık, 1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm genişliğindedir. Kirpikli ve hareketli, zorunlu asepturler (6). İdeal olarak aerob ortamda ürerse de, son elektron alıcısı olarak ortamda nitrat bulunması durumunda anaerob koşullarda da üreyebilir (14). Karbonhidratları fermente etmez, karbonhidratlardan glikoz ve ksilozu oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururken maltozu etkilemez. Üç şekerli demirli besiyerinde alkali reaksiyon verir ve gaz oluşturmazlar (6,13). Jelatin hidrolizi, arjinin dihidrolaz, üreaz ve sitrat testleri pozitif, lizin dekarboksilaz, indol, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir (13).

P. aeruginosa, ilk kez Gessard tarafından 1882 yılında mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır (8). Kültürlerde piyosiyenin adı verilen çözümlü fenazin pigmenti üretmesi *P. aeruginosa*'nın en önemli özelliklerinden biridir. Ayrıca mavi pigmentten sorumlu piyosiyenin, kırmızı pigmentten sorumlu piyoverdin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti üretebilir (6). Diğer pseudomonas türleri piyosiyenin pigmenti üretemezler. Piyoverdin pigmenti floresan grubun diğer üyeleri olan *P. fluorescens* ve *P. putida* tarafından da üretilir (14).

P. aeruginosa 10-44 °C ısı aralığında üreyebilmesine karşın optimal 30-37 °C 'de ve hafif alkali ortamda kolayca ürerler. 4 °C' de üreyememesi ve 42 °C' de üreyebilmesi ile floresan gruptaki diğer psikrofil pseudomonaslardan olan *P. putida* ve *P. fluorescens*'den ayrılır (6,15). Pseudomonas'lar ısıya dirençsizdirler. 55 °C de 1 saat ve 60 °C' de 15 dakikada ölürler (16).

2.1.2. Epidemiyoloji

P. aeruginosa sağlıklı bireylerde deride %0.2, burun mukozasında %0-3.3, boğazda %0-6.6, dışkıda %2.6-24 oranında insanların normal florasında görülebilir (17, 18).

P. aeruginosa enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gelişir (10). Enfeksiyonun hangi aşamada kalacağını konağın savunma sistemi ve bakterinin virülans faktörleri belirler. Enfeksiyon kolonizasyon aşamasında kalabilir veya sistemik enfeksiyona ilerleyebilir (11). Hastanede yatan yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde, antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılığı olabilmektedir (18). Klinik örneklerden *P. aeruginosa* dışında bir *Pseudomonas* saptanması, hastanın geçici kolonizasyonuna, örnek alınması veya laboratuvar uygulamaları sırasındaki bulaşmaya bağlı olabilmektedir (19). *P. aeruginosa*'nın nozokomiyal enfeksiyonlar arasında en sık pnömoneye neden olduğu bildirilmektedir (15). *P. aeruginosa* suşlarından elde edilen aşılar *Pseudomonas* sepsisine karşı koruma amacıyla immün yetmezlik, yanık, lösemi, kistik fibrozis gibi yüksek risk grubundaki hastalara uygulanabilmektedir (20). *P. aeruginosa* birçok dezenfektana dirençlidir. Sabunlar ve iyotlu solusyonlar içinde üreyebilirler. *Pseudomonas*ların dezenfeksiyonunda fenoller ve betagluturaldehit etkili olabilir. Kaynar su mikroorganizmayı öldürür (16, 37). Aktif klorür iyonları içeren antiseptikler yara yüzeylerinin dezenfeksiyonunda yararlıdır (21).

Hastanede yatan hastalarda *P. aeruginosa* enfeksiyonuna yol açan risk faktörleri; mekanik solunum cihazına bağlı olma, uzamış geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, kemoterapi, cerrahi yara ve yanıklardır. Hastanede yatan hastaların aksilla, perine, dış kulak gibi vücut bölgeleri ve lavabo, musluklar, tuvaletler, duşlar gibi nemli cansız yüzeylerden izole edilebilir. Mekanik solunum cihazı, gıda hazırlama cihazları gibi suyla temas eden cihazlar hastane kaynaklı salgınlardan sorumlu tutulmaktadır (22).

P. aeruginosa'nın hastane kaynaklı enfeksiyonlarının değerlendirildiği geniş çaplı çalışmalarda; pnömonilerin %16' sından, idrar yolu enfeksiyonlarının %12' sinden, bakteriyemilerin %10' undan ve cerrahi bölge enfeksiyonlarının %8' inden sorumlu olduğu saptanmıştır (23). Toplum kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonları ise banyo, sauna, jakuzi, yüzme havuzlarından kazanılan cilt enfeksiyonları, dış kulak yolu enfeksiyonu (yüzücü kulağı), küçük çocuklarda spor ayakkabı giymeye bağlı gelişen ayak parmağı enfeksiyonları, travma sonrası gelişen endoftalmit veya damar içi madde bağımlılarında gözlenen endokardit gibi bazı özel koşullarda gerçekleşir (24, 25, 26, 27).

2.1.3. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi

P. aeruginosa birçok hücre dışı enzim ve toksin salgılar. Bu enzim ve toksinler konağın farklı dokularına etkili olurlar. Virülansla en fazla ilişkili bulunan proteazlar elastaz ve alkalın proteazdır. Bu proteazlar deri, akciğer ve korneada nekrotizan etkiye sahiptir. Ektima gangrenosum pseudomonas sepsisinde görülür ve sorumlu olan elastaz kan damarlarında internal laminayı yıkarak hemorajilere neden olur. Bu enzimler sitotoksik değildir. Hücreler arasındaki bağlantıları parçalayarak etki gösterir (28).

2.1.4. *P. aeruginosa*'nın virulans faktörleri

P. aeruginosa'nın virülansından sorumlu yapısal ve hücre dışı enzimleri bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'da piluslar, polisakkarid kapsül, lipopolisakkarit, ekstrasellüler proteaz, hemolizin, ekzotoksin A, ekzoenzim S, nöraminidaz, sitotoksin, piyosiyenin ve enterotoksin gibi pek çok virülans faktörü vardır (36). Kirpik (flagella), pili (fimbriya) lipopolisakkarit (LPS), aljinat hücre yüzeyinde bulunan virulans faktörleridir. Elastaz, piyosiyenin, ramnolipid fosfolipaz C, ekzotoksin A, sitotoksin hücre dışına salgılanan virulans faktörleridir. Bakteri yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonda önemli rol oynar.

2.1.4.1. Flagella

P. aeruginosa'nın hareketinden sorumludur. Flagella pililer gibi epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar (38).

2.1.4.2. Pili (Fimbriya)

Pililer en önemli aderans faktörüdür. Konağın epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan sialik asitsiz gangliosid (GM-1) reseptörlerine tutunmayı sağlar (10). Pili, solunum

yollarında kolonizasyona yardımcı olan biyofilm oluşumunda da rol almaktadır (39).

2.1.4.3. Lipopolisakkarit

Konak savunmasına karşı etkilidir. Bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan LPS; fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. O bölgesi zinciri kompleman lizisine karşı koruyucudur. Ayrıca varyasyonları ile antimikrobiyal proteinlerin etkisine direnç gösterir (38, 41). *P. aeruginosa*, ısıya dirençli O antijenlerine göre 17 tipe ayrılmıştır. En yaygın serotipin serotip O:2-5-8-11-12-16 olduğu görülmüştür. Bunların arasında en dirençli serotip O:16, en duyarlı serotip O:8 dir (40). Kistik fibroz hastalarında *P. aeruginosa*'nın farklı lipid A mutantları bulunur ve bunlardan bazıları konağın antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gösterir (41).

2.1.4.4. Aljinat

Aljinat mukoid bir ekzopolisakkarittir. Bakteriyi solunum yolu epiteline adezyonunda rol alır. Kistik fibrozis hastalarından izole edilen izolatlar aşırı aljinat üretimine bağlı olarak mukoid görünümündedir. Aljinat bakteriyi fagositozdan ve antibiyotiklerin etkilerinden korur. Aljinat kistik fibrozis hastalarında bulunan biyofilm yapısında yer almaktadır (42, 43, 44). Ayrıca alginate, aminoglikozitlerin *P. aeruginosa*'ya karşı bakterisidal etkisini bozabilir (28). Alginat tekrarlayan mannuronik asit ve glukoronik asitlerin sonlarında bulunur. Bu yapı bazı koşullarda, polisakkarid kapsül yapan *P. aeruginosa* suşlarında bulunur. Hücre dışında bulunan bu yapıya slime tabakası denildiği gibi glikokaliks veya mukoid ekzopolisakkarid olarak da tanımlanır. Slime tabakası bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir, onu iyice tesbit eder (37, 38).

2.1.4.5. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm mikroorganizmanın içine gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşan bir matrikstir. Herhangi bir yüzey veya birbirlerine

yapışmalarını sağlar (45). Biyofilm içerisindeki bakteri hem fenotipik hemde metabolik değişimlere uğradığı için besin eksikliğine, pH değişimlerine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (46, 47). Biyofilm oluşumu, hücreden hücreye iletişimi sağlayan sinyal molekülleri aracılığıyla kontrol edilmektedir. Bu sinyal sistemi Quorum-sensing (Çoğunluğu algılama QS) olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm oluşumunda las sistemi merkezi rol oynar. Mukoid suşlar oluşturduğu biyofilm nedeni ile mukoid olmayanlara göre antibiyotiklere daha az duyarlıdır (49, 50, 51, 52).

2.1.4.6. Quorum-sensing (Çoğunluğu algılama)

Bakteriler sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını algılamaktadır. Yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda virulans faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir (48,53). Quorum sensing olarak bilinen bu süreçte las sistemi ve rhl sistemi olarak adlandırılan iki farklı sistem tanımlanmıştır. *P. aeruginosa* suşlarında bulunan QS sistemi RhlI / RhlR sistemidir. Sinyal molekülleri belirli bir yoğunluğa ulaştığında *rhlR* geninin transkripsiyonunu uyarır ve hedef genin aktivasyonu sağlanır (54, 55, 56). Ayrıca Rhl sistemi tarafından üretilen AHL molekülü ile ramnolipid, piyosiyenin, “swimming” (yüzme), “swarming” (kayma) ve “twitching” (titreme) hareketi gibi virulans faktörlerinin üretimi uyarılır (49,50, 52). Elastaz, alkalin proteaz, hemolizin, ramnolipid ve ekzotoksin A ve biyofilm gibi virülans faktörleri Quorum-sensing sistemi tarafından regüle edilir (38). QS sisteminde kullanılan sinyal molekülleri üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Açıl-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) türevleri, küçük peptitler, furanosil borat diester’ dir (58). QS sisteminde kullanılan sinyal molekülleri türden türe değişmektedir. AHL sinyal molekülleri gram negatif bakteriler, küçük peptit sinyal molekülleri gram pozitif bakteriler, furanosil borat diester ise gram negatif veya gram pozitif bakteriler tarafından kullanılmaktadır (54, 58). *P. aeruginosa*’ ya özgü olan PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) sinyal molekülü ise hiçbir gruba dahil değildir (60).

P. aeruginosa dışında *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* gibi bakterilerle, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi mantar türlerinde çeşitli QS sistemleri tanımlanmıştır (52, 54).

2.1.4.7. Elastaz

Nötrofil kemotaksisini engelleyip, bakterilerin yayılımını arttırarak akut infeksiyonlarda doku hasarına neden olur (10). Elastini sinerjistik olarak indirgeyen iki enzim olan LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz), akciğer parankim dokusu ve diğer elastin içeren dokulardaki hasarla ve yaygın hemorajik lezyonlarla (ektima gangrenozum) ilişkilidir (19).

2.1.4.8. Alkalın proteaz

Doku hasarına ve infeksiyonun yayılmasına neden olur. Konak bağışık yanıtına da etkilidir (19).

2.1.4.9. Piyosiyenin

Piyosiyenin, fluoresens vermeyen, suda ve kloroformda eriyen fenazin grubundan mavi-yeşil pigment özelliğinde olan kimyasal bir maddedir (63). Piyosiyenin hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi serbest oksijen radikallerinin üretimini katalize eder (14). Akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarından ve solunum yolları siliyer aktivitesinin kesintiye uğramasından sorumludur (6, 9, 10). Nötrofil aktivasyonunu sağlayan interlökin-8 salınımını da uyarır (19).

2.1.4.10. Piyoverdin

Piyoverdin, fluoresens grupta yer alan suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresens veren, sarı-yeşil renkte bir pigmenttir (63). Bu pigment, *P. aeruginosa*'nın metabolizması için gerekli olan demiri bağlayarak virülansta yer almaktadır (65).

2.1.4.11. Fosfolipaz C

P. aeruginosa iki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir. Lipit A endotoksini organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Fosfolipaz C, surfaktanın bir bölümü olan fosfatidilkolini parçalayarak, pulmoner atelettazinin gelişmesine neden olurlar (21, 32, 66).

2.1.4.12. Ramnolipid

Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C' nin etki etmesine yardımcı olur. Solunum yollarındaki mukosilyer aktiviteyi inhibe eder (66).

2.1.4.13. Ekzotoksin A

Ekzotoksin A ise hücre dışı bir enzim olup, elongasyon faktör 2' yi (EF2) inaktive ederek protein sentezini inhibe eder (6). *P. aeruginosa'* nın en önemli virülans faktörüdür. Protein sentezini nikotinamid adenin dinukleotidin (NAD), ADP riboz parçasının elongasyon faktör 2 ile kovalent bağlanmasını sağlayarak, polipeptit uzatma basamağını bloke eder. 613 aminoasitten oluşan hücre dışı bir enzimdir (68). Lokal nekroza ve enfeksiyonun sistemik yayılmasına neden olur (10).

2.1.4.14. Ekzoenzim S veT

Protein sentezini inhibe eder. Ayrıca doku invazyonu ve nekrozu kolaylaştırıcı etkisi vardır (19).

2.1.4.15. Lökosidin

Nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını inhibe eder (14).

2.1.4.16. Enterotoksin

Normal gastrointestinal aktiviteyi bozarak diyareye yol açar (10, 14).

2.2. *P. aeruginosa* enfeksiyonları

P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olup çoğunlukla nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (69).

2.2.1. Solunum sistemi enfeksiyonları

Alt solunum yolu enfeksiyonları çoğunlukla konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında bozukluk olduğunda görülür. Nötropenik hastalarda, mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda, kistik fibrozisli hastaların akut alevlenmelerinde görülür (16, 29, 30, 32, 34). Kistik fibrozis hastalarının %80' inden çoğu 15-20 yaşına kadar *P. aeruginosa*' ya bağlı akciğer enfeksiyonu geçirirler (9). Otozomal geçişli kistik fibroz (KF) hastalığında, epitel hücresi membranında klorür ve bikarbonat kanalının düzenleyici proteini olan CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) protein üretilmez veya işlevsel olmayan bir protein üretilir (87). CFTR üretiminde kayıp veya fonksiyonlarında bozulma sonucu bronş epitel apikal yüzeyi ve visköz muköz tabaka arasında bulunan hava yolu yüzey sıvısının tuz konsantrasyonu artarak dehidratasyona ve dolaylı olarak mukosilyer aktivitenin bozulmasına ve mukus tıkaçları oluşmasına neden olarak *P. aeruginosa* kolonizasyonuna yatkınlık sağlar (9). Çoğunlukla kistik fibrozlu hastalardan izole edilen mukoid *P. aeruginosa* suşlarının polisakkarit kapsülü vardır (28).

2.2.2. Bakteriyemi

P. aeruginosa' ya bağlı bakteriyemi, hastanede kazanılan primer gram negatif bakteriyemiler içinde dördüncü sıklıktadır. Ektima gangrenosum, *Pseudomonas* bakteriyemisinin ayırt ettirici önemli bir özelliğdir (16, 32, 34, 35).

P. aeruginosa, hematojen yayılım sonucu veya penetre edici travma ile ilişkili komşu bir odağın yayılımı sonucu septik artrit ve osteomyelitte neden olabilir (29, 30).

2.2.3. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa, kanserlilerde *Listeria monocytogenes*' den sonra ikinci sıklıkla menenjit etkeni iken; *E.coli*' den sonra ikinci sıklıkta, beyin apsesi etkeni olarak bulunmuştur (16, 32, 34, 36). Beyin cerrahisi, kafa travması, intraventriküler şant ve BOS sızıntısı ile komplike menenjit ve beyin apselerine neden olur (29, 30).

2.2.4. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonları, ektima gangrenosum, subkutan nodüller, sellülit, apse, veziküller, püstüller veya makülopapüler lezyonlar, büller veya nekrotizan fasiit ve gangren gibi ortaya çıkan metastatik odaklar, intravenöz ilaç kullananlarda doğal kapak endokarditi ve prostetik kapak endokarditi *P. aeruginosa*' ın neden olduğu başlıca enfeksiyonlardır (29, 30). *P. aeruginosa*, bakteriyel kornea ülseri, keratit ve endoftalmite sık neden olan etkenlerdendir (32, 34, 35, 37). Ayrıca diyabetik hastalarda kulakta nekrotizan otitis eksterna ve nörolojik sekellere yol açarak hayatı tehdit edebilen yüzücü kulağına neden olur (38). Bunların dışında *P. aeruginosa* hastanede kazanılmış üriner sistem enfeksiyonları, diyare ve özellikle bebeklerde öldürücü nekrozlu enterokolite neden olabilir (32, 34, 35, 37).

2.3. Laboratuvar Tanısı

P. aeruginosa izolasyonunda alınacak örnek, enfeksiyonun yerine göre balgam, idrar, pü, beyin omurilik sıvısı, yanık sürüntüleri vb. olabilir. Laboratuvarlarda triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukulata agar, Mueller Hinton agar (MHA) ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37 °C' de kolaylıkla üreyebilir. Gram negatif çomak şeklinde görüntüsü, üzüm benzeri kokusu, yassı koloni tipi ve pigment oluşumu ile kolaylıkla ayırt edilmekle birlikte, oksidaz pozitifliği, üç şekerli demirli besiyerinde fermentasyon yapmaması, 42 °C' de üreyebilmesi gibi özellikleri ile tanımlanabilmektedir(70). Konvansiyonel ve biyokimyasal testlerin yanında kullanılabilen otomatize sistemler yüksek oranda doğru tanımlama yaparak kısa sürede sonuç verebilmektedir (70).

2.4. Tedavi

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde pseudomonaslara karşı etkili olan piperasilin, seftazidim, sefepim, imipenem, meropenem ve aztreonam kullanılmaktadır. Pseudomonas suşları, ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprima doğal dirençlidir (71). Tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, kloramfenikol, sefiksim, sefpodoksime ise kural olarak dirençlidir (62).

Üreidopenisilinler, karboksipenisilinler, 3. kuşak sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, aminoglikozidler, kinolonlar ve polimiksinler *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkili antibiyotiklerdir (15). Toplumdan kazanılmış *P. aeruginosa* izolatları genellikle antipseudomonal penisilinlere (tikarsilin, piperasilin), aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), siprofloksasin, sefoperazon, seftazidime, meropeneme ve imipeneme duyarlıdır (62). Florokinolonlar içinde en etkili olanı siprofloksasindir. Aminoglikozitler içinde, gentamisine direnç en yüksek, amikasine ise en düşük orandadır. Tobramisin ise gentamisinden daha etkilidir (72). *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında en yaygın kullanılan kombinasyon genellikle sinerjik etki gösteren beta-laktam ve aminoglikozit kombinasyonudur (73).

Pnömonilerde florokinolonlar ile beta-laktam antibiyotiklerin kombinasyonu sinerjik olarak bulunmuştur. Karbapenem ve kinolon kombinasyonunun antagonistik etkili de olabileceği için bu kombinasyon yapılırken dikkate alınmalıdır (74).

2.4.1. Beta-laktam Antibiyotikler

Pseudomonas ve diğer nonfermentatif etkenler için önerilen başlıca beta-laktam antibiyotikler şunlardır piperasilin, seftazidim, aztreonam, sefepim, karbapenemler piperasilin-tazobaktam, tikarsilin-klavulonik asittir (75,179). Beta-laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanabilir:

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktamlar
4. Karbapenemler
5. Betalaktamaz inhibitörler (klavulonik asit, sulbaktam, tazobaktam)' dir.

Tüm β -laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarı sentezinin seçici inhibitörleridir ve bu nedenle üreme fazındaki bakteriye karşı aktiftir. Etkilerini peptidoglikan sentezinde görevli transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak gösterirler. İlaç etkisindeki ilk adım ilacın hücre reseptörlerine (penisilin bağlayıcı protein; PBP) bağlanmasıdır. Farklı reseptörlerin aynı ilaca afinitesi farklıdır ve her biri farklı bir etki yapar. *P. aeruginosa*' da enzimatik (penisilinaz, GSBL, sefalosporinaz) ve nonenzimatik (pompa sistemleri, porin kaybı) mekanizmalar beta-laktam ilaçlara dirençte rol oynar (76).

2.4.1.1. Penisilinler

*Pseudomonas*lara etkili penisilinler karbenisilin, tikarsilin, azlosilin, mezlosilin, piperasilin, beta-laktam inhibitörlü penisilinlerdir (179). *P. aeruginosa*' da ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavunata direnç indüklenebilir kromozomal AmpC β -laktamazlar ve çeşitli effluks pompa sistemleri ile meydana gelir (72).

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda piperasilin duyarlılığı %56 ile %87.5 arasında değişmektedir (76,77). Piperasilin-tazobaktam duyarlılığı ise %60 oranında tespit edilmiştir (78).

2.4.1.2. Sefalosporinler

Penisilinler gibi, duyarlı organizmaların PBP' lerine bağlanarak bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezini bozarlar. Üçüncü kuşak sefalosporinler *P. aeruginosa'* ya çok etkilidir. *P. aeruginosa'* ya etkili başlıca sefalosporinler; seftazidim, sefepim ve sefoperazondur. Betalaktamazlara dayanıklılığından ve gram negatif basillerin hücre duvarından kolayca geçebilmelerinden dolayı etki güçleri oldukça iyidir (72, 179). Üçüncü kuşak sefalosporinler, enfeksiyonların ampirik tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durum, gerek dereprese mutantların seleksiyonuna, gerekse GSBL sentezleye bakterilerin ortaya çıkmasına neden olarak tedavide başarısızlık ve mortalite oranlarında artışa yol açmaktadır (79). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar *P. aeruginosa* suşlarının seftazidime duyarlılığını %50 civarında saptamıştır (79,80). Sefepim ve seftazidime duyarlılığı sırasıyla %57, %60 duyarlı olarak tespit etmiştir (77, 80).

2.4.1.3. Monobaktamlar

Bu grubun bilinen en önemli üyesi aztreonamdır. Aztreonam diğer beta-laktam antibiyotiklerden yapısında beta-laktam halkasına ekli başka bir halka olmamasıyla ayrılmakta olup, Gram negatif bakterilerin PBP-3 (penisilin bağlayan protein-3)'üne bağlanarak hücre duvarı sentezini durdurmaktadır. Aztreonam, yalnızca aerobik gram-negatif mikroorganizmalara etkilidir. Gram pozitif ve anaeroblara etkisi yoktur. Aztreonam sefalosporinleri parçalayan betalaktamazlardan etkilenir. Ülkemizde son yıllarda hastane patojenleri arasında sefalosporinlere paralel olarak aztreonama da önemli oranda direnç saptanmıştır. Metallobetalaktamaz pozitif olgularda, kolistin veya aztreonam tedavide kullanılabilirdiği gibi, aztreonam, amikasin ve seftazidim kombinasyonunun da, etkinliği yüksek olarak bildirilmektedir (189,190).

2.4.1.4. Karbapenemler

Karbapenemlerden *P. aeruginosa*' ya karşı etkili olanlar imipenem ve meropenemdir. Meropenem imipenemden daha etkilidir. Ertapenem *P. aeruginosa*' ya karşı etkisizdir (82, 83). Meropenemin *P. aeruginosa*' daki PBP2 ve PBP3' e karşı yüksek afinitesi olmasına karşın, imipenemin afinitesi sadece PBP2' ye karşıdır(83, 84). Meropenem için asıl hedef *P.aeruginosa*' daki PBP3' dür (82, 83, 85).

Cesur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada imipenem ve meropeneme duyarlılık oranını sırasıyla imipenem ve meropeneme duyarlılık oranını sırasıyla %61.7, %51.7 olarak bulurken (78), Azık ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropeneme duyarlılık oranını sırasıyla %92, %87 olarak bulunmuştur (77).

2.4.1.5. Betalaktamaz inhibitörler (Klavulonik asit, sulbaktam, tazobaktam)

Betalaktamaz inhibitörleri yapısında β -laktam halkası taşıyan ancak tek başlarına kullanıldıklarında antibakteriyel etkileri olmayan veya zayıf antibiyotik etkisi gösteren kimyasal maddelerdir. Bu inhibitörler, penisilin türevini hidrolizden korur (72). *P. aeruginosa*' ya etkili başlıca kombinasyon piperasilin-tazobaktam ve tikarsilin-klavulonik asittir (75, 179).

2.4.2. Aminoglikozitler

Bakteri ribozomlarının 30 S alt birimine irreversibl bağlanarak, ribozomlarda protein sentezini inhibe eder ve mRNA' nın taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına işlevsiz bir protein sentezlenmesine neden olurlar (86). *P. aeruginosa*' ya etkili başlıca aminoglikozitler; gentamisin, netilmisin tobramisin amikasin (179). Netilmisin ve amikasin aminoglikozit modifiye edici enzimlerin çoğuna dirençlidir. Netilmisin *P. aeruginosa*' ya karşı intrensek olarak tobramisin ve gentamisinden daha az etkilidir ve gentamisine dirençli *Pseudomonas* izolatlarının çoğu genelde netilmisine dirençlidir (72). Gündüz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada duyarlılık oranlarını amikasin %96, netilmisin %94, tobramisin %91 ve gentamisin %59 olarak saptamışlardır (89).

2.4.3. Kinolonlar

Kinolonlar, DNA girazı bloke ederek mikroorganizmanın DNA sentezini inhibe ederler (90). *P. aeruginosa*' ya karşı en etkili kinolon siprofloksasin olup, ikinci olarak 3. kuşak kinolonlardan olan ofloksasindir (75,179).

2.5. Antibiyotik direnç mekanizmaları

P. aeruginosa çeşitli direnç mekanizmalarıyla antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Kromozomal ve plazmid kaynaklı betalaktamazların üretimi, antibiyotik hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılması başlıca direnç mekanizmalarıdır (93). Klinikte en sık karşılaşılan direnç betalaktamaz enzimleri aracılığıyla olan, beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına yol açan mekanizmadır (12). *P. aeruginosa*' lar betalaktamazlar, karbapenemazlar, dış membran geçirgenliğinde azalma ve aktif dışa pompalama mekanizmaları ile betalaktam antibiyotiklere direnç; aminoglikozit değiştirici enzimlerle aminoglikozitlere; DNA giraz enzim mutasyonları ile kinolonlara direnç kazanırlar (94). Ayrıca *P. aeruginosa* farklı kromozomal mutasyonlarla, plazmidler, transpozonlar veya integronlar aracılığıyla taşınan direnç genlerinin horizontal kazanımı yoluyla direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir (72).

2.5.1. Aktif Dışa Pompa (Efluks) Sistemi

Efluks pompa sistemi sıklıkla dış membran geçirgenliğinde azalma ile birlikte çalışarak beta-laktam antibiyotikler, florokinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, trimetoprim/sulfametoksazol ve aminoglikozidlere direnç oluşumuna neden olur (167, 168). *P. aeruginosa*' nın efluks pompa sistemi yapısal ve fonksiyonel olarak birbirine bağımlı 3 proteinden oluşmaktadır. Enerji bağımlı pompa sitoplazmik membranda (örneğin; MexB), porin proteini dış membranda (örneğin; OprM) ve bu ikisi arasındaki periplazmik aralıkta üçüncü bir protein (örneğin MexA) yer almaktadır (168).

Dört major efluks pompa sistemi (MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN) *P. aeruginosa*' da antibiyotik direncine neden olur. MexAB-OprM sisteminde, MexA periplazmik bağlayıcı proteini, MexB sitoplazmik proteini ve OprM ise dış membran kanalını tanımlar. MexAB-OprM pompaları intrinsik çoklu dirence katkıda bulunmaktadır. MexXY-OprM veya MexCD-OprJ pompaları ise kazanılmış dirençle ilişkili bulunmuştur (169, 170). Efluks pompa sistemi çoğul direnç genine sahip fenotipler oluşturur. MexAB-OprM efluks pompa sistemi imipenem hariç tüm betalaktamlara ve kinolonlara direnç oluşmasında önemlidir. MexCD-OprJ efluks pompa sistemi 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN aktif pompalama sistemi karbapenemlere dirence neden olabilir (167, 169, 170, 171).

P. aeruginosa' da bulunan efluks pompa sistemleri Tablo 2' de gösterilmiştir.

2.5.2. Dış Membran Porin Defektleri

Dış membran porin defektleri gram negatif bakterilerde intrinsik (doğal) dirence neden olur. Dar porin proteinleri nedeniyle etkili bir bariyer oluşturarak, hidrofilik maddelerin ve düşük akışkanlıktaki lipopolisakkaridlerin permeabilitesini ve lipofilik maddelerin hücre içine difüzyonunu kısıtlar. Bununla birlikte *P. aeruginosa* gibi son derece düşük permeabilite gösteren bakterilerde dahi pek çok antibiyotiğin periplazmik konsantrasyonu, dış konsantrasyonun %50' sine kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle dış membran bariyeri geniş intrinsik direnci tek başına açıklayamaz, betalaktamazların üretimi ve efluks pompa sistemi ile kombine bir intrinsik direnç söz konusudur.

P. aeruginosa dış membranındaki asıl porin proteini OprF' dir. Diğer yardımcı porin proteinleri OprB, OprC, OprD, OprE şeklindedir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının antimikrobiyal ilaçlarla tedavisinde OprD porin proteini (eski literatürlerde OprD2) kaybı sonucu karbapenem direnci gelişmekte olup, imipeneme direnç gelişirken meropeneme ise duyarlılıkta azalma görülmektedir. Bu durum meropenemin farklı kanallardan dış membranı geçebildiğini göstermektedir. Ayrıca OprD porin proteini kaybına bağlı olarak karbapenem direnci gelişimi sadece kromozomal AmpC tipi betalaktamaz üreten suşlarda görülmekte olup bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki olduğunu düşündürmektedir (117, 169).

2.5.3. Aminoglikozid Direnci

Pseudomonaslarda aminoglikozid direnci ile ilgili çeşitli direnç mekanizmaları saptanmıştır. En önemli mekanizma bakteriyel aminoglikozid fosforiltransferaz, aminoglikozid asetiltransferaz, aminoglikozid adeniltransferaz enzimleri ile aminoglikozidlerin modifikasyonudur. Dış membran permeabilitesindeki değişiklikler ve aktif efluks pompa sistemi diğer önemli aminoglikozid direnç mekanizmalarıdır. Daha nadir olarak ribozomal hedeflerdeki değişiklikler (16S rRNA' nın metilasyonu) ve kromozomal kaynaklı aphA gen mutasyonları da aminoglikozid direncine neden olmaktadır (117, 170).

Tablo 2. *P. aeruginosa*' da bulunan efluks pompa sistemleri (117)

Sistem	Düzenleyici gen	Mutasyon geni	Substratlar
MexAB-OprM	mexR	nalB ve nalC	İmipenem hariç beta laktam antibiyotikler , kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, trimethoprim, sulfonamid, novobiosin, akriflavin, etidyum bromid, sodyum dodesil sülfat, aromatik hidrokarbonlar, triklosan, irgasan, homoserin laktan.
MexCD-OprJ	nfxB	nfxB	İmipenem hariç beta laktam antibiyotikler , kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, trimethoprim, sulfonamid, novobiosin, akriflavin, sodyum dodesil sülfat, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexEF-OprN	mexT	nfxC	Kloramfenikol, florokinolonlar, trimethoprim, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexXY-OprM	mexZ		Aminoglikozidler, karbenisilin, seftazidim ve imipenem hariç beta laktamlar, kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, novobiosin

2.5.4. Kinolon Direnci

P. aeruginosa' da kinolon direncine iki major mekanizma yol açar, ilk mekanizma enzimler üzerindeki yapısal değişikliklerdir. DNA giraz (Topoizomeraz II) enzimidaki aktif bölgeyi kodlayan *gyrA/gyrB* genlerinde oluşan nokta mutasyonlar sonucunda enzimin A ve B subünitlerinin aminoasit dizilimleri değişerek, enzimin kinolonlara olan affinitesi azalır. Kinolonların diğer hedefi olan topoizomeraz IV enzimini kodlayan *parE* ve *parC* genlerindeki nokta mutasyonlar da dirence yol açmaktadır. İkinci önemli mekanizma aktif efluks pompa sistemi ile gelişen dirençtir. Bu mekanizma ile bakteri florokinolonların yanı sıra tetrasiklinler, kloramfenikol ve eritromisine de direnç gösterir (176, 177).

2.5.5. Betalaktamazlar

Betalaktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotikleri etkisiz hale getirerek direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Bu enzimler beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağına parçalayarak bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Betalaktamaz enzimi indüklenebilir veya yapısal olabilir. Gram pozitif bakterilerde enzim genellikle indüklenebilir iken, gram negatif bakterilerde betalaktamazların bir kısmı indüklenebilir, bir kısmı da yapısal özelliكتedir. Betalaktamaz genleri bakteri plazmidi, kromozomu, transpozon veya integron gibi taşınabilir genetik elemanlar üzerinde bulunabilir (100).

Her gram negatif bakteri türe özgül olmak üzere genellikle az miktarda kromozomal betalaktamaz sentezlemektedir (101).

İlk plazmid kökenli betalaktamaz olan TEM-1 1965' te bir *E.coli* izolatında bildirilmiştir (102). Penisilin tedavide kullanılmaya başlamasından sonra ilk olarak *Staphylococcus aureus*' ta, daha sonra da farklı bakterilerde plazmid kökenli penisilinaza bağlı penisilin direnci saptanmıştır (100).

Yapısal olarak PBP' lere benzeyen betalaktamazlar, hem gram pozitif hem de gram negatif aerop ve anaerop bakteriler tarafından sentezlenir. Gram pozitif bakteriler arasında betalaktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*ların betalaktamazları esas olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes*ler tarafından üretilen betalaktamazlar ise sıklıkla sefalosporinlere etki eder (103).

Gram negatif bakterilerde betalaktam direncindeki en önemli mekanizma betalaktamaz üretimidir. Gram negatif bakterilerde betalaktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik aralıkta bulunurken, gram pozitif bakterilerde doğrudan hücre dışına salınmaktadır. Bu nedenle gram negatif bakteri türlerinde betalaktamazlara bağlı dirençte sıklıkla antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır (103).

Betalaktamazların ilk sınıflandırılması 1940 yılında Abraham ve Chain' in penisilinazı bildirerek yapmışlardır. Bundan sonra Sawai 1968 yılında enzimleri penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayırmıştır. Richmond ve Sykes ise 1973 yılında yaptıkları sınıflandırmada o güne kadar bilinen tüm gram negatif bakteri betalaktamazlarını substrat profillerine göre beş grupta toplamışlardır. 1981' de Mitsunashi ve Inoue' nin yaptığı sınıflamaya sefuroksimi hidrolize eden betalaktamazlar kategorisi de eklenmiştir (106).

Moleküler yapı ile ilgili sınıflandırma ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Sınıf C sefalosporinazlar 1981 yılında Jaurin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidrolize eden D sınıfı enzimler ise 1980' lerin sonunda diğer serin enzimlerden ayrılmıştır. 1980' lerin sonlarına doğru beta-laktam/beta-laktam inhibitörlerinin yaygın kullanımıyla inhibitör rezistan TEM enzimleri, 1990' larda sefamisinlerin kullanımıyla plazmid kaynaklı Amp-C tipi enzimler, daha sonra da karbapenemlerin yaygın kullanımıyla karbapenemazlar ortaya çıkmıştır (106).

1989' da Bush tarafından önerilen gruplamada tüm bakterilerin betalaktamazları yer almıştır (105). Betalaktamazların sınıflandırılmasında en sık kullanılan sınıflama Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırılmasıdır. Bush ve arkadaşları substrat özgüllüğü ve betalaktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel alındığı fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri sınıflandırmış ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram ile ilişki kurulabilmesi gibi avantajlar sağlamıştır (106).

Betalaktamazların en yeni sınıflandırma şeması 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre betalaktamazların 4 gruba ayrıldığı sınıflandırmadır. Grup 1' de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar, grup 2' de betalaktamaz inhibitörlerine duyarlı olan moleküler sınıf A ve D içinde yer alan enzimler, grup 3' te EDTA dışında betalaktamaz inhibitorlerine duyarlı olmayan metallobetalaktamazlar, Grup 4' te ise klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır (111).

Revize edilmiş Bush sınıflaması substrat özgüllüğünü ve betalaktamaz inhibitörlerine duyarlılığı esas alan fenotipik bir sınıflandırmadır. Bu fenotipik sınıflandırmanın en büyük dezavantajı substrat özgüllüğünün ve betalaktamaz inhibitörlerine duyarlılığın nokta mutasyonlar nedeniyle büyük oranda değişebilmesidir (106, 111).

Ambler tarafından 1980 yılında yapılan A-D arası grubu kapsayan nükleotid dizilerine göre yapılan betalaktamaz enzimlerinin moleküler sınıflandırması mutasyonlardan etkilenmemektedir (96). Bu sınıflandırmada A, C ve D sınıfı enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulunurken, B sınıfı enzimler aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinim duyarlar. *P. aeruginosa*' da bu dört sınıf betalaktamazların çoğu bulunmaktadır (106, 111, 117, 118).

Sınıf A: Penisilinlere karşı oldukça aktifken yine bu grupta yer alan geniş spektrumlu beta-laktamazların bazıları karbapenemlere karşı aktif değildir.

Sınıf B: Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallobetalaktamazlardır.

Sınıf C: AmpC enzimler olarak da adlandırılan grup sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden OXA-tipi enzimleri içeren serin betalaktamazlardır (118).

Gram negatif bakterilerde betalaktamaz enzimleri kromozom veya plazmid kontrolünde sentezlenmektedir (121). Kromozoma bağlı direnç, spontan mutasyonlar sonucunda bakteri hücrelerinde meydana gelen yapısal değişiklikler ile hücrelerin ilaca geçirgenliğinde değişme ve hücre içinde ilacın hedeflediği yapılarda değişiklikler oluşabilir (122). Kromozomal kaynaklı betalaktamazlar tüm gram negatif bakterilerde bulunmaktadır. İndüklenebilir olan ve Bush sınıflandırmasında Grup 1' de yer alan sefalosporinaz aktivitesi gösteren grup en önemlileridir (106, 111).

Klinikte gözlenen direncin çoğundan kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen plazmidler sorumludur. Direnç plazmidleri (R plazmid) farklı antibiyotiklere karşı direnç genleri duyarlı bakterilerle taşıyarak dirençli hale gelmesine neden olurlar. Bu dirençte daha çok antibiyotikleri inaktive eden veya hücre zarı permeabilitesini değiştiren enzimler rol oynamaktadır (122).

Plazmidlerce kodlanan betalaktamazlar dört moleküler sınıfta da yer almaktadır. En önemlileri gram negatif bakterilerdeki TEM-1,TEM-2 ve SHV-1 enzimleridir. Geniş spektrumlu enzimler olarak adlandırılan bu enzimler moleküler sınıf A fonksiyonel grup 2b' de yer alırlar. Klavulanik asit ile inhibe olan bu grup ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin, sefamandole direnç oluştururken yeni sefalosporinlere, monobaktamlara ve sefamisinlere etkisizdirler (125).

1980' li yıllarda betalaktamazlara dayanıklı genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlerin geliştirilmesinden kısa bir süre sonra *K. pneumoniae* suşlarında plazmid kontrolünde olan çeşitli betalaktamazlar tanımlanmıştır. Bu enzimlerin nokta mutasyonları sonucu 1-2 aminoasit değişikliği ile TEM veya SHV enzimlerinden köken alan bu enzimlere genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL) denilmektedir (106, 125).

Betalaktamaz grupları ve genel özellikleri tablo 3' de görülmektedir.

2.5.5.1. Kromozomal AmpC Tipi Betalaktamaz Enzimleri (İndüklenebilir Beta-laktamazlar İBL)

İBL' lerin yapısal genlerine ampC adı verilmektedir ve bunlar ampR denilen aktivatör represör genler (LysR tip transkripsiyonel genler) tarafından kontrol altında tutulur. Bu bölge ampD genlerinin baskılayıcı etkisi altındadır (106).

Doğal olarak kromozomda AmpC geninde kodlanmış olan bu grup enzimler Pseudomonaslar dışında Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Morganella, Yersinia ve Hafnia gibi Enterobacteriaceae' larda da bulunmaktadır. Bu grup enzimler betalaktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar, genellikle oksiminosefalosporinlere (sefotaksim ve seftriakson) ve sefamisinlere dirençlidirler. İBL sentezleyen bakterilerde 10^5 - 10^7 sıklığında devamlı yüksek düzeyde enzim sentezleyen dereprese denilen mutantlar oluşmaktadır (106, 127). Dereprese mutantlar İBL sentezleyen bakteri topluluklarında zayıf indükleyicilerle tedavi sırasında ortaya çıkabilen labil betalaktamazlardır. 2. kuşak, 3. kuşak sefalosporinler, aztreonam, üreidopenisilinler ve karboksipenisilinler zayıf indükleyicidirler. Dereprese mutantların seleksiyonunda infeksiyonun yeri, bakteri yoğunluğu, antibiyotiğin dağılımı ve kullanılan antibiyotikler önemlidir. Karbapenemler hem indükleyici hem de dereprese mutantlara etkili olduğu için seleksiyona yol açmaz (106, 127).

İBL varlığı laboratuvarından bildirilmemiş olsa da *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *Serratia spp*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *Pseudomonas* ve *Hafnia alvei* türlerinin bu özellikte olduğu ve antibiyogramlarda yalancı olarak antibiyotiklere duyarlı görülebilecekleri unutulmamalıdır. Bu suşlarla gelişen infeksiyonlarda 2. ve 3. kuşak sefalosporinler ve aztreonam'ın tek başlarına kullanılmasından kaçınılmalıdır. Dereprese betalaktamazlar sentezleyen ve aynı zamanda dış membran porinleri eksik olan *P. aeruginosa* suşları vardır. Bunlar birçok betalaktam antimikrobiyal yanında karbapenemlere, sefepim ve sefpiroma da dirençlidirler (110).

İndüklenebilen AmpC tipi betalaktamazı olmayan bakteri türlerinde kromozomal betalaktamazların aşırı üretimi ile olan direnç özelliğinin görülmesi plazmid kaynaklı AmpC tipi betalaktamazı düşündürmelidir (125).

Karbapenemler İBL sentezleyebilen *P. aeruginosa* suşlarında indükleyici etki yaparlar fakat dereprese mutantlara bakterisidal etkili oldukları için seleksiyona yol açmazlar (134).

Kromozomal AmpC tipi betalaktamazların üretiminden sorumlu birkaç gen vardır. Bunlardan AmpR pozitif transkripsiyonel düzenleyici gen (aktivatör-baskılayıcı) olup esas indüksiyondan sorumludur. AmpG geni ise indüksiyonla ilgili sinyal üretiminde görev alan bir transmembran proteinini kodlar. Üçüncü gen AmpD, indüksiyonu baskılayıcı özellikte bir proteini kodlar. Dördüncü gen AmpE, indüksiyon için gerekli bir sitoplazmik membran proteinini kodlar. AmpC tipi betalaktamazlar normalde düşük miktarda ekspresse edilirken, bazı beta-laktam antibiyotikler ile (özellikle imipenem) karşılaştıklarında üretimleri 100 ile 1000 kat artar. Bu sayede betalaktamaz üretebilen dereprese mutantlar seleksiyona uğrar. *P. aeruginosa* doğal olarak seftazidime, aztreonama, karboksipenisilinlere duyarlı iken en sık bu mekanizma ile 3. kuşak sefalosporinlerin tümüne direnç kazanabilir (92, 117). Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya aztreonamın İBL sentezlediği bilinen bakteriler ile gelişen infeksiyonlarda monoterapide kullanılması dereprese mutantların seleksiyonuna yol açmaktadır. İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile, *P. aeruginosa* izolatlarının bu özellikte olduğu dikkate alınmalıdır. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında, kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç gelişebileceğinden bu suşların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması önerilmektedir (92, 117).

Kromozomal AmpC betalaktamaz genlerinin plazmidlere aktarılması ile plazmid kökenli AmpC tipi enzimler de ortaya çıkmıştır. Bu tip enzimler indüklenebilir özelliklerinin olmayışı ile kromozomal kökenli olanlardan ayrılırlar. Plazmid kökenli AmpC tipi enzimlerin bir kısmı kromozomal olanlarla çakışmakta ise de çoğunluğu farklıdır. Başlıca plazmid kökenli AmpC tipi enzimler; BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1, LAT-1, MIR-1 ve MOX-1 olup, bu enzimler Enterobacteriaceae üyeleri arasında yaygındır. Enterobacteriaceae' dan farklı olarak *P. aeruginosa* izolatlarında plazmidle ilişkili sefalosporinazlar bulunamamıştır. Ancak plazmidlerce kodlanmış bazı sefalosporinaz enzimlerinin Pseudomonas AmpC tipi betalaktamazlarla yapısal benzerliği dikkat çekicidir (117). Kromozomal betalaktamaz enzimlerinin çoğunluğu moleküler sınıf C' de yer alır fakat sınıf A ve sınıf B içinde de bulunabilirler. Farklı substratlara olan etkilerine göre Bush sınıflandırmasında grup 2b, 2be, 2e ve grup 3 içerisinde yer alırlar (118).

2.5.5.2. Karbenisilini Hidrolize Eden Betalaktamazlar

P. aeruginosa' da karbenisilini hidrolize eden dört çeşit pseudomonas spesifik enzim tipi tanımlanmıştır. Bunlar; PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 ve CARB-4. Karboksipenisilinler ve üreidopenisilinler bu enzimlerin etkiledikleri substratlardır. Moleküler sınıf A ve fonksiyonel Grup 2c' de yer alırlar. PSE-1, PSE-4 ve CARB-3 birbirleriyle yakın ilişkili enzimlerdir. Ancak bu üç enzim CARB-4 ile sadece %86.3 oranında DNA homolojisi gösterirler. Karbenisilinaz üreten suşların seftazidim, seftazidim ve aztreonama duyarlılıkları değişken olup; seftazidim ve karbapenemlere %100 duyarlıdırlar (117).

Tablo 3. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri (14).

Beta-laktamaz grubu	Alt grup	Moleküler sınıf (Ambler)	Substrat	Özellik
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir) Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2		A, D		Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM-SHV-1)
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL)
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) betalaktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	Penisilin, oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan Sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a, 3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktam	Metallobetalaktamazlar
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

2.5.5.3. Genişlemiş Spektrumlu Betalaktamazlar

Klinik *P. aeruginosa* izolatlarında GSBL' lar, 1990 yılından sonra saptanmaya başlamıştır. Enterobacteriaceae ailesinde iyi tanımlanmış olan TEM ve SHV tipi enzimlerin dışında, *P. aeruginosa*' da başka enzimler de tanımlanmıştır. Bunlar; PER (çoğunlukla Türkiye' den), VEB (Güneydoğu Asya, Fransa ve Bulgaristan), GES/IBC (Fransa, Yunanistan ve Güney Asya) ve BEL enzimleridir. Bu enzimlerin hidrolize edici etkileri birbirlerine benzer olsa da, genetik düzeydeki benzerlikleri düşüktür (117).

TEM ve SHV tipi GSBL enzimlerine ait genler muhtemelen gen transferi yoluyla Enterobacteriaceae ailesine üye bakterilerden, *P. aeruginosa*' ya aktarılmıştır. *P. aeruginosa* için tam olarak tanımlanmış ilk GSBL enzimi olan PER-1 Fransa' da 1991 yılında bir Türk hastanın idrar izolatında kromozoma kodlanmış olarak bulunmuştur. Daha sonra plazmide kodlanmış PER-1 enzimleri bildirilmiş olup, bugün için Türkiye' deki nozokomiyal *P. aeruginosa* suşları arasında çok yaygındır. Ayrıca Belçika, Polonya ve İtalya' da da bu enzimi üreten suşlar bulunmuştur. PER-1 klasik GSBL' ler ile aynı substrat profilini sergilemekle birlikte, betalaktamaz inhibitörleri ve imipenem ile bir dereceye kadar inhibe edilebilmektedir (117, 134, 137).

VEB-1 ilk olarak 1998' de Fransa' da izole edilmiştir. VEB enzimlerinin substrat profilleri de PER enzimleri gibidir (137).

20. yüzyıl sonunda yeni bir enzim olan GES (Guiana extended spectrum) Fransız Guiana' sında tanımlanmış ve izole edildiği bölgeye göre adlandırılmıştır. GES-1 ve GES-2 enzimleri sırasıyla Fransa, Brezilya ve Güney Afrika' da bulunmuştur. GES-1 enziminin pek çok substrata affinitesi düşüktür. Çoğu sınıf A GSBL' dan farklı olarak GES-1 ikinci kuşak sefalosporin olan sefoksitine güçlü affinite gösterir. 2000 yılında bulunan GES-2 ise GES-1' den 100 kat daha fazla karbapenemaz aktivitesine sahiptir fakat bu aktivite moleküler sınıf B' de yer alan metalloenzimlerin karbapenemaz aktivitesine göre çok daha düşüktür. GES enzimlerinin yeni varyantları olan GES-5, GES-8 ve GES-9' un aktiviteleri klavulanik asit, tazobaktam ve imipenemle baskılanabilmektedir (117, 137).

BEL-1 enzimi yakın zamanlarda Belçika' da bulunmuş yeni bir Ambler sınıf A GSBL enzimidir. Geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen bu enzimin aktivitesi tazobaktam, klavulanik asit, sefoksitin, monobaktam ve imipenemle baskılanabilmektedir (117).

Beta-laktam antibiyotiklerin çoğunu hidrolize etmelerinden dolayı GSBL' ler tedavide önemli bir sorundur. GSBL' ler sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksım, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksimino-sefalosporinleri benzilpenisilinle eşit ya da %10 daha fazla hidrolize edebilen, aktif bölgelerinde serin içeren ve betalaktamaz inhibitörleri ile inhibe olabilen betalaktamaz enzimleridir (125, 127).

TEM enzimleri içeren GSBL' ler moleküler sınıf A, fonksiyonel grup 2be 'de yer alırlar. Bu enzimler penisilinleri, tüm sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize ederler, beta-laktam inhibitörlerine duyarlıdırlar. Günümüzde sayısı 130' u aşmış TEM türü, 50' yi aşkın SHV türü betalaktamaz saptanmıştır. TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 *P. aeruginosa*' da bulunan GSBL' lerdir (106).

TEM grubu betalaktamazlar, *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *E. aerogenes*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp.* gibi Enterobacteriaceae üyelerinde sık görülmektedir. TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 *P. aeruginosa*' da bulunan GSBL' lerdir (125, 127).

1990' lı yıllarının başında betalaktamaz inhibitörlerine dirence neden olan, inhibitör rezistan TEM betalaktamaz (İRT) olarak adlandırılan enzimler ilk olarak amoksasilin-klavulanik asite dirençli *E. coli*' de bildirilmiştir. SVH enzimleri içeren GSBL' ler moleküler sınıf A, fonksiyonel grup 2b' de yer alırlar. SHV grubu enzimler ilk olarak *K. pneumoniae*' da kromozomal olarak saptanmıştır. Daha sonra *C. diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*' da bildirilmiştir. Ampisilin, tikarsilin, piperasiline direnç oluşturmaktadır ve oksimino sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (125, 127).

OXA türü GSBL' ler moleküler sınıf D fonksiyonel grup d' de yer alırlar. Etki spektrumları sefotaksim, sefepim, sefpirom, aztreonam ve monolaktamı da kapsar. OXA-18 hariç diğerlerinin aktiviteleri betalaktamaz inhibitörleri ile baskılanmaz. Sınıf D genişlemiş spektrumlu oksasilinazların çoğu Türkiye'deki klinik izolatlarda bulunmuştur (111, 133, 140, 141).

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi' nde yatan bir hastadan izole edilen bir pseudomonas suşunda bulunmuştur (125, 127, 130, 139).

OXA-11, 14, 15, 16 enzimleri seftazidime dirence yol açar (111,140, 141). OXA-17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır. OXA-31 sefepime dirençli seftazidime duyarlıdır (125, 127, 129, 130, 139).

OXA-31 ise sefepim direncine neden olur, fakat seftazidime etkisizdir (111,140, 141). 2003 yılında ABD’ de, MDR bir *P. aeruginosa* klinik izolatında yeni bir D sınıfı GSBL olarak OXA-45 enzimi bulunmuştur. Bu enzimin substrat profili OXA-18 ile benzer olup, aktivitesi klavulanik asitle baskılanabilmektedir (139).

OXA-20, OXA-23, OXA-24, OXA-45 karbapenamaz aktivitesi gösterirler. Ancak GSBL değildirler (125, 127, 130, 139).

Genişlemiş spektrumlu oksasilinazların çoğu plazmid veya integronlardaki genlerde kodlanmıştır. Bu durum direncin kolayca yayılmasına ve bu enzimleri üretebilen izolatlarının prevalansının artmasına neden olmaktadır (117, 134).

CTX-M grubu enzimler, substrat olarak sefotaksimi tercih eden plazmid aracılıklı GSBL’ lerdir. CTX-M grubu GSBL’ lerde tazobaktamın inhibitör özelliği diğer beta-laktamaz inhibitörlerine göre daha fazladır (106, 111).

Sınıf A GSBL’leri kodlayan genlerin yayılması, antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynayarak; hayatı tehdit edebilen *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisindeki antibiyotik seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu yayılmada plazmidler ve integronlar önemli rol oynamaktadır. *P. aeruginosa*’daki TEM ve SHV enzimlerini kodlayan genlerin çoğunun plazmid lokalizasyonları gösterilmiştir. GSBL enzimlerini kodlayan genlerin eş zamanlı olarak hem kromozomda hem de plazmidlerde saptanmış olması, transpozonların bu gen taşınmasındaki önemini göstermektedir (117, 137).

Moleküler sınıf A ve fonksiyonel grup 2b’ de yer alan GSBL enzimleri PSE enzimlerinden farklı olarak, sadece karboksipenisilinlere ve üreidopenisilinlere değil; aynı zamanda geniş spektrumlu sefalosporinlere (seftazidim, sefepim, sefpirom) ve aztreonama da direnç gelişimine yol açarlar. Karbapenemlere affiniteleri düşüktür. Klavulanik asit ve tazobaktam ile aktiviteleri inhibe edilebilir (111, 134, 137).

BEL-1 enzimi yakın zamanlarda Belçika’ da bulunmuş yeni bir Ambler sınıf A GSBL enzimidir. Geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen bu enzimin aktivitesi tazobaktam, klavulanik asit, sefoksitin, moksolaktam ve imipenemle baskılanabilmektedir (117).

Son yıllarda TEM, SHV, OXA veya CTX-M betalaktamazlardan köken almamış yeni GSBL’ ler bulunmuştur. Bunların ilki plazmid kontrolünde olan PER-1 Türkiye’ de *P. aeruginosa*’ dan izole edilmiştir. Daha sonra *A. baumannii*’ de, *Salmonella spp.*’ de izole edilmiştir (131, 138, 142, 143, 144).

PER-1 enziminin özelliği, seftazidime çok dirençli olmalarına karşın piperasiline daha az dirençli olmalarıdır. Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır. Ayrıca bölgesel ağırlıklı olmak üzere BES-1, FEC-1, CME-1, TLA-1, PER-2, VEB-1, GES-1 ve imipenem direncini de taşıyan GES-2 Fransa' da *P. aeruginosa* ' da tespit edilmiştir (142, 143).

2.5.5.4. Plazmid kaynaklı AmpC Betalaktamazlar

Plazmid kaynaklı AmpC üretiminden ampR regülatör geninin kaybı sonucu yüksek seviyelerde enzim üretimi sorumlu tutulmuştur. Bu enzimler çoğunlukla *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella spp*, *P. mirabilis* ve *E. coli* ' de bildirilmiştir. AmpC betalaktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamları inhibe eder. Ayrıca dış membran porin kaybı ile karbapenem direncine de yol açar. GSBL' lerden farklı olarak sefamisinleri de inhibe etmekte ancak ticari olarak mevcut olan betalaktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedir. Plazmid kaynaklı AmpC betalaktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamlara karşı aktivite gösterir (142).

2.5.5.5. Karbapenemazlar

Yapısal olarak bulunan karbapenemazlar 1980 yıllarının başlarında nonfermantatif bakteriler ve *Aeromonas* türlerinde saptanmıştır. Bu grup karbapenemazlar aktif bölgelerinde çinko içermeleri nedeniyle moleküler sınıf B' de yer alırlar, klinik önemleri henüz açık değildir. Kazanılmış karbapenemazlar sadece karbapenem direncinden değil, aynı zamanda beta-laktam antimikrobiyallerin direncinden de sorumludur. Moleküler sınıf B kazanılmış karbapenemazlar *Acinetobacter spp*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter spp* ' de, moleküler sınıf D' de *Acinetobacter spp*, sınıf A ise *Enterobacterler* ' de saptanmıştır (147, 148, 149). Kromozomal kaynaklı veya kazanılmış enzimler olan karbapenemazlar; Ambler moleküler sınıflandırmasında A, B ve D sınıflarında yer alırlar. Moleküler sınıf A karbapenemaz (KPC-1, KPC-2, KPC-3 ve GES-1, GES-2) enzimleri aktif bölgelerinde serin içerirler ve aktiviteleri klavulanik asit ile baskılanır (111, 134, 147, 149).

Moleküler sınıf A' da yer alan karbapenemazlardan SME-1 ve SME-2 *S. marcescens*' den, NMC-A ve IMI-1 *E. cloacae*' dan, KPC-1 ve GES-1 *K. pneumoniae*' dan izole edilmiştir. Karbapenem direncinin yanında penisilin ve aztreonam direnci de mevcuttur. En fazla tazobaktam olmak üzere diğer beta-laktam inhibitörlerine duyarlıdırlar. Meropenemden çok imipenem direnci daha belirgindir. Bu direnci taşıyan suşlarda karbapenemazların yanında Amp-C tip betalaktamazları ve TEM-1 tip betalaktamazları birlikte sentezleyebilmelerinden dolayı geniş spektrumlu bir beta-laktam antibiyotik direnci oluşturabilirler. Moleküler sınıf D' de yer alan OXA tipi enzimler oksasilinaz aktivitesi gösterirler. Acinetobacter izolatlarında OXA-23,24, 25, 26, 27 tipi, *P. aeruginosa*' da OXA-2, 10, 18, 24 tipi saptanmıştır. Bunlar karbapenemaz aktivitesi gösterirler (147, 148, 149).

Moleküler sınıf D karbapenemazlar aktif bölgelerinde sınıf A' da olduğu gibi serin içerirler, ancak betalaktamaz inhibitörlerine duyarlılıkları daha düşüktür (111,134).

2.5.5.5.1. Metallobetalaktamazlar

Klinik açıdan en önemli karbapenemaz olan ve MBL olarak bilinen bu karbapenemazlar Ambler sınıf B veya Bush grup 3' de yer alırlar. Aztreonam dışındaki tüm beta-laktamları hidrolize eden IMP ve VIM metalloenzimleri içerirler. Aminoasid dizilim homolojisine göre 4 tip MBL saptanmıştır. Bunlar IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL' lerdir. MBL' ler fonksiyonel olarak 3a, 3b ve 3c alt gruplarına ayrılır. Grup 3a' da imipenem ve penisilinler güçlü, sefalosporinler zayıf hidrolize olur. 3b enzimleri gerçek karbapenemazlardır çünkü karbapenem hidrolizi spesifiktir. 3c enzimleri ise *L. Gormanii* ve *Stenotrophomonas maltophilia*' da bulunur (147, 148, 149).

IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL' lar *P. aeruginosa*' da tanımlanmıştır. IMP-1 (Imipenemase) enzimi Japonya' da 1992-1994 yılları arasında, karbapenem dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında gösterilmiştir. Önceleri sadece kromozomal olarak kodlandığı düşünülen bu enzimin *blaIMP-1* geninin plazmid ve integrona yerleşik olduğu saptanmış ve direncin aktarılabılır olması nedeniyle kaygılara yol açmıştır. 2000-2001 yılları arasında diğer IMP varyantları dünya genelinde çeşitli gram negatif bakterilerde tanımlanmıştır:

blaIMP-7 Kanada' da (2002 yılında) ve Singapur' da (2004 yılında),

blaIMP-9 Çin' de (2006 yılında),

blaIMP-13 İtalya' da (2005 yılında) *P. aeruginosa* izolatlarında bulunmuştur.

Brezilya’ da 2004 yılında bir *P. aeruginosa* suşunda bulunan IMP-16 MBL enzimini kodlayan gen kromozomda class 1 integronda kodlanmış olup, bu integronda aynı zamanda aminoglikozid modifiye edici enzimleri kodlayan genlerin de yer aldığı gösterilmiştir. IMP-18 MBL enzimi ise ABD’ de 2006 yılında izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur (153, 154, 155, 156, 157, 158, 159).

IMP tipi MBL üreten bakteriler ciddi bir tehlike olarak görülmektedir. IMP-1 enzimini kodlayan *blaIMP-1* geni pozitif olan *P. aeruginosa* suşlarıyla yapılan bir çalışmadaki enfeksiyona bağlı ölüm oranı, *blaIMP-1* negatif izolatların enfeksiyonlarına göre anlamlı derecede daha yüksek olarak bulunmuştur (160).

İlk MBL enzimi 1960 yılında *Bacillus cereus*’ ta bulunmuş, daha sonra İtalyada 1997 yılında nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatında bulunmuş olan VIM-1 (Veronese imipenemase) MBL enzimi kazanılmış MBL olan VIM ailesinin ilk temsilcisidir. Daha sonra aynı enzim İtalya ve Fransa’da 2004-2005 yıllarında *P. aeruginosa* izolatlarında saptanmıştır. *blaIMP* geni gibi *blaVIM-1* geni de class 1 integrondaki gen kasetinde aminoglikozid direncini kodlayan genlerle birlikte yer almaktadır. VIM-1 enziminin IMP ailesi ile %30’ dan daha az aminoasit benzerliği olmasına karşın, genişlemiş spektrumlu hidrolitik etkisi aynıdır.

Farklı metallobetalaktamaz enzimlerinin etki spektrumlarının benzer olması ortak $\alpha\beta\alpha$ katlantı yapısına sahip olmaları ve aktif bölge yapılarının süperpoze olmasından kaynaklanmaktadır (161,162). Ayrıca aminoasit yapılarının çok benzer olduğunda bile enzimin substrata olan ilgisi (Km değeri) değişebilmekte ve etki spektrumlarında farklılıklara yol açabilmektedir. Bunun en tipik örneği VIM-1 ve VIM-2 enzimleridir (161,162). Tüm dünyada *P. aeruginosa*’ da en yaygın olan MBL enzimi VIM-2’ dir. Bu yaygınlık *blaVIM-2* geninin lokalizasyonu ile ilişkili olup, *blaVIM-2* allelinin mobil gen kasetleri ile taşındığı gösterilmiştir. İntegrona yerleşmiş olan direnç genleri yayılım potansiyeline sahiptir ve class 1 integronlar transpozonların yapısında bulunmuştur. Bu durum integronlara yer değiştirme olanağı sağlayarak, çeşitli bakteri türleri arasında VIM-2 enziminin yayılması riskini gündeme getirmektedir. VIM-3 metalloenzimi Tayvan’da 2001 yılında ilk kez izole edilmiş olup, *blaVIM-3* kromozomal bir gendir. Bundan sonrada *P. aeruginosa* izolatlarında VIM tipi MBL enzimleri (VIM-4, VIM-5, VIM-7, VIM-8, VIM-11, VIM-13, VIM-16) bulunmuştur (117).

P. aeruginosa’ da bulunan MBL enzimleri Tablo 4’ te gösterilmiştir.

2002 yılında Brezilya'da plazmide yerleşik *blaSPM-1* geni bulunmuş olup, bu geni taşıyan izolatin kolistin dışında gram negatif bakterilere etkili tüm antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM-1 (Sao Paulo MBL) enzimi IMP ve VIM ailesinden anlamlı oranda yapısal farklılık göstermektedir (IMP-1 ile sadece %35' lik aminoasit homolojisi) ve *blaSPM-1* geni transpozon veya integronlar içinde yer almayıp sadece plazmidde bulunmaktadır (152).

2002 yılında diğer bir MBL enzimi alt sınıfı olan GIM-1 (German imipenemase) enzimi Almanya'da bulunmuştur. GIM-1 diğer üç alt sınıftan farklı yapısal özelliğindedir (%28-43 aminoasit homolojisi). Plazmide veya class 1 integrona yerleşebilen bu enzim aztreonamı ve serin betalaktamaz inhibitörlerini hidrolize edemez (110).

Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya karbapenemlerin yaygın kullanımı MBL enzimini kodlayan genlerin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin bulunduğu class 1 integronlarda genellikle aminoglikozid direncini kodlayan *aacA4* geni de bulunmaktadır. Böylece beta-laktam antibiyotiklerin yanı sıra aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir. Aminoglikozid ve beta-laktam antibiyotikler için direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilir ancak bir mikroorganizmadan diğerine kendi başlarına hareket edemezler. Plazmidler ve transpozonlar gibi genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar (107, 108, 109, 124).

Genel olarak MBL üreten *P. aeruginosa*' lar aztreonam dışındaki bütün beta-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. MBL üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde bu antibiyotikler kullanılamaz. Ayrıca aminoglikozid direncine neden olan *aacA4* geni ile MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yan yana bulunması aminoglikozid direncine de neden olabileceğinden MBL pozitif *P. aeruginosa*' ların tedavisinde aztreonam dışındaki bütün beta-laktam antibiyotiklerin ve aminoglikozidlerin tercih edilmemelidir (124). Plazmide veya class 1 integrona yerleşebilen bu enzim aztreonamı ve serin betalaktamaz inhibitörlerini hidrolize edemez (110).

Tablo 4. *P. aeruginosa*' da bulunan MBL enzimleri (117).

Enzim	Coğrafik yayılım	Kodlayıcı gen yerleşimi
IMP tipi enzimler		Plazmid veya kromozomlardaki integronlar
IMP-1	Japonya	
IMP-7	Singapur	
IMP-9	Kanada, Singapur	
IMP-13	Çin	
IMP-16	İtalya	
IMP-18	Brezilya, ABD	
VIM tipi enzimler		Plazmid veya kromozomlardaki integronlar
VIM-1	İtalya, Fransa, Yunanistan	
VIM-2	Fransa, İtalya, Yunanistan, İspanya, Almanya, Portekiz, Polonya, Rusya, İrlanda, Türkiye, Venezuela, Kore, Japonya, Çin, Suudi Arabistan, Hindistan, ABD, Kolombiya, Kanada	
VIM-3	Taylan	
VIM-4	Yunanistan, Macaristan, Polonya, İsveç	
VIM-5	Türkiye	
VIM-7	ABD	
VIM-8	Kolombiya	
VIM-11	Arjantin, İtalya	
VIM-13	İspanya	
VIM-15	Bulgaristan	
VIM-16	Almanya	
SPM-1	Brezilya	Plazmid
GIM-1	Almanya	Plazmid ve integron

2.6. İndüklenebilir Betalaktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri

2.6.1. Disk İndüksiyon Yöntemi

0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar besiyeri yayıldıktan sonra sefoksitin veya imipenem gibi güçlü bir betalaktamaz indükleyicisinin çevresine (diskler arası 20 mm olacak şekilde) zayıf indükleyiciler olarak aztreonam veya 3. kuşak sefalosporin diskleri yerleştirilir.

Plaklar 37 °C’ de bir gece inkübe edildikten sonra zayıf indükleyici disk zon çaplarının güçlü indükleyiciye bakan kısımlarında belirgin zon çapı daralmasının görülmesi (zon çapının bu kısımda ≥ 4 mm daralmış olması) İBL enzimi üretimini gösterir (96, 97, 115).

2.6.2. İndükleyici Ajanın Besiyerine Eklenmesi

Hazırlanan bakteri süspansiyonu (0.5 McFarland bulanıklığında) Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra, aztreonam veya diğer zayıf indükleyici 3. kuşak sefalosporin diskleri standart miktarda imipenem içeren ve içermeyen besiyerlerine yerleştirilir. Plaklar 37 °C’ de bir gece inkübe edildikten sonra İmipenem içeren besiyerindeki inhibisyon çapının imipenem içermeyene kıyasla 3 mm veya daha dar olması İBL enzimi üretimi pozitif olarak değerlendirilir (95, 96, 97, 115).

2.7. Metallobetalaktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri

MBL üreten suşlar monobaktam hariç tüm betalaktamlara dirençlidirler. CLSI önerdiği bir tarama testi bulunmamaktadır. MBL aktivitesinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve 2-merkaptopropionik asit (MPA) gibi metal şelatörler ile inhibe olma özelliklerinden yararlanılarak bu enzimleri erken tanıyabilecek tarama amaçlı basit fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. İmipenemli veya seftazidimli EDTA veya MPA disklerinin kullanıldığı Çift Disk Sinerji testi, Hodge-testi, seftazidim veya imipenemli EDTA Kombine Disk testi, MBL E-test ve imipenemli EDTA kullanılan mikrodilüsyon testidir. Ayrıca doğrulama amaçlı olarak moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

2.7.1.Modifiye Hodge testi

Hodge ve arkadaşları *N. gonorrhoeae*’ de penisilinaz aktivitesinin gösterilmesi için Hodge testini kullanmışlardır. Lee ve arkadaşları ise MBL enziminini saptamak için Modifiye Hodge testini geliştirmişlerdir.

Bu test penisilinaz üreten *N. gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge testinin MBL üretimini göstermek için *S. aureus* (ATCC 25923) yerine *E.coli* (ATCC 25922), penisilin diski yerine ise imipenem diski kullanılması ile modifiye edilmiştir. İmipeneme duyarlı bir bakterinin MBL üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğu imipeneme rağmen üreyebilmesi esasına dayanmaktadır (98,114). *E.coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilir, plağın merkezine IPM diski (10 µg) yerleştirilir. Test suşları, bu diskin dört bir kenarından periferde doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35 °C’ de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çarpıklık veya yonca yaprağı görünümü pozitif olarak kabul edilmiştir. Yöntemi geliştiren Lee ve ark. Yaptıkları çalışmalarda imipenem diskine veya Mueller-Hinton agar besiyerine sırasıyla; 140 µg/ml ve 70 µg/ml çinko sülfat eklenerek testin duyarlılığının artırılabilirliğini saptamışlardır (98, 114).

2.7.2. Çift Disk Sinerji Testleri

MBL saptanması çalışmalarında imipenem ve seftazidim disklerinin EDTA, MPA, merkaptasetikasit (SMA) emdirilmiş disklerle yapılan Çift Disk Sinerji testleri kullanılmıştır. Bunlar;

- IMP-EDTA Çift Disk Sinerji testi,
- IMP-MPA Çift Disk Sinerji testi,
- CAZ-MPA Çift Disk Sinerji testi,
- CAZ-SMA Çift Disk Sinerji testi,
- IMP-EDTA-SMA Çift Disk Sinerji testidir.

Bu tarama testinde; test edilecek seftazidime dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL üretimini saptayabilmek için seftazidim diski etrafındaki inhibisyon zonu ile MPA veya SMA arasında oluşacak sinerjinin araştırılması esastır. MBL inhibitörü olarak CuCl₂ 100 mM (5µl); FeCl₂ 100 mM (5µl); EDTA, 100 mM (5µl); tiyol bileşikleri (2-merkaptopropionik asit, merkaptasetik asit, merkaptoetanol) dilüe edilmeden (2-3µl) kullanılmış ve en iyi sonuçlar 2-merkaptopropionik asit ile elde edilmiştir (91). İmipeneme dirençli suşlar ile yapılan Çift Disk Sinerji testlerinde seftazidime dirençli olan suşlar ile yapılanlara göre daha iyi sonuçlar alınmıştır (91, 98, 113, 114, 174).

Ağır metallerle yapılan testlerde de inhibitör zonlarında genişleme olmuştur, ancak PCR ile yapılan testler MBL varlığını doğrulamamıştır (91).

2.7.3. Kombine Disk Testi

Test suşları CLSI' nin önerdiği disk difüzyon yönteminde olduğu gibi Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine ekilir. Plağa ikişer adet IPM (10 µg) diski yerleştirilir, disklerin birer tanesine 10 µl 0.5 M EDTA solüsyonu eklenerek kombine diskler (10 µg) oluşturulur. 35 °C' de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülür, IPM diski ve bu disklerin EDTA ile kombine edildiği disklerin etrafındaki zon çapları arasındaki fark her bir suş için kaydedilir. EDTA' lı diskin çevresindeki inhibisyon zon çapı, EDTA' sız disk zon çapından en az 7 mm veya daha büyükse sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir (113).

2.7.4. MBL E Test Yöntemi

IMP ya da CAZ' e, EDTA ya da 2-MPA eklenerek E-test stripleri geliştirilmiştir. Walsh ve ark.' nin çalışmasında MHA' a CLSI önerdiği şekilde test edilecek bakteri ekimi yapılır. Plaklar kurduktan sonra E-test stripleri yerleştirilir. 35 °C' de inkübe edilir ve 16-18 saat sonra IMP için bulunan MİK değeri, IMP/EDTA için bulunan MİK değerine oranlandı. Üretici firmanın önerilerine göre ≥ 3 dilüsyonluk (≥ 8 kat) fark saptanan izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanılır (112).

2.7.5. Moleküler Yöntemler

Bakterinin MBL geni taşıyıp taşımadığını moleküler yöntemlerden Polymerase Chain Reaction (PCR), Multilocus Sequence Typing (MLST), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile MBL enzimi ve gen tipini saptamak mümkündür (114).

3. MATERYAL ve METOD

2009-2013 tarihleri arasındaki dört yıllık süre içerisinde Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatları çalışma kapsamına alındı. Hastaların aynı dönemde birden fazla kültür örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarından yalnızca bir tanesi çalışmaya dahil edildi. Aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma kapsamı dışında tutuldu.

İstatistiksel analiz, hastanın yaşı, numune tipi ve kliniklere göre dağılımı çoklu gruplar arasında Oneway Anova, tekli gruplar arasında ise Student T Testi ve Pearson Corelasyon testi uygulanarak belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. January 2013) yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına ait elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (SPSS Incorporated, Chicago) programında ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

Antibiyotik disk difüzyon testlerinde imipenem 10µg (IMP), meropenem 10µg (MEM), aztreonam 30µg (ATM), seftazidim 30µg (CAZ), sefepim 30µg (FEP), gentamisin 10µg (CN), amikasin 30µg (AK), tobramisin 30µg (TOB), netilmisin 30µg (NET), siprofloksasin 5µg (CIP), piperasilin 100µg (PRL), piperasilin/tazobaktam 110µg (TZP), sefoperazon/sulbaktam 105 µg (SCF) antibiyotik diskleri kullanıldı (OXOİD, Hampshire, England). İzolatlar klasik yöntemlerle identifiye edildi. Nonfermentatif, oksidaz pozitif, aerop, hareketli, Blood Agar ve Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid, Hampshire, England) besiyerinde 37 °C ve 42 °C' de üreyen, +4 °C' de üremeyen, karakteristik kokusu olan ve mavi-yeşil pigment yapan suşlar *P. aeruginosa* olarak değerlendirildi. Çalışma gününe kadar izolatlar Tryptic Soy Broth saklama besiyerlerine alınarak -70 °C' de stoklandı.

Çalışmada kontrol suşları olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Antibiyotik disk difüzyon testleri ve İBL tespiti, imipenem ve meropenem E test (OXOİD, United Kingdton) Modifiye Hodge testi, IPM/EDTA Kombine Disk testi ve MBL E test (BİOMERIEUX Fransa) yöntemlerinde MHA plakları kullanıldı.

Antimikrobiyal duyarlılık testi için 0.5 McFarland'a göre hazırlanmış bakteri süspansiyonlarının ekimi MHA (Mueller-Hinton agar) üzerine yapıldı.

Mueller-Hinton agar (OXOID, Hampshire, England) besiyeri hazırlamak için toz halindeki ticari besiyerinden 38 g tartılarak 1000 ml' lik deiyonize su içerisinde çözüldü. Sıcak su banyosu içerisinde 60 °C' de eritildikten sonra, 1 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Besiyerinin ısısı 50 °C' ye düşünce, 90 mm çaplı steril petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldü. MHA plakları her bir çalışma günü için taze olarak hazırlandı. Antimikrobiyal duyarlılık testi için daha önce -70 °C' de stoklanmış olan *P. aeruginosa* izolatları Blood Agar (Kanlı agar), Eosin Metilen Blue (EMB) agar besiyerlerine pasajlanarak etüvde bir gece 35 °C' de inkübasyona bırakıldı. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra saf olarak üremiş olan *P. aeruginosa* kolonilerinden 0.5 McFarland' a göre hazırlanmış bakteri süspansiyonlarının ekimi MHA üzerine yapıldı. 15 dakikalık süre içerisinde antibiyotik diskleri 20 mm aralıklarla plaklara yerleştirildi. Plaklar 35 °C' lik etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. January 2013) yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi (183). Disk difüzyon testi sonuçlarına göre imipenem ve/veya meropenem dirençli ya da orta derecede duyarlı olarak bulunan izolatlarda E test yöntemi ile MİK değeri belirlenerek (MİK değeri 4 g/ml duyarlı, 8 g/ml orta derecede duyarlı, 16 g/ml dirençli) karbapenem direnci doğrulandı. 0,02-32 µg/ml imipenem (IP) ve 0,02-32 µg/ml meropenem (MP) içeren E test şeritleri (OXOID, United Kingdom) kullanıldı. E test üretici firmanın önerilerine göre çalışıldı. Kanlı agar plaklarında üremiş olan taze *P. aeruginosa* kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlanarak MHA plağına ekildi. 15 dakikalık süre içerisinde imipenem ve meropenem E test şeritleri plaklara yerleştirildi ve 35 °C' lik etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda E test şeritleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilerek imipenem ve meropenem MİK değerleri belirlendi.

İBL üretimi, disk induksiyon yöntemi ile tespit edildi. MHA plağında İBL aktivitesini belirlemek için disk merkezleri arası uzaklık 20 mm olacak şekilde, petriye seftazidim ve aztreonam disklerinin ortasına imipenem diski yerleştirildi. 35 °C' lik etüvde 18-20 saat inkübasyondan sonra MHA plağındaki seftazidim ve aztreonam disklerine ait inhibisyon zon çaplarının imipenem ve meropenem diskiye bakan kısımlarındaki daralma (≥ 4 mm) İBL üretimi pozitif olarak değerlendirildi. Her bir izolat için imipenem göre İBL pozitifliği değerlendirildi. Negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı (115, 116).

MBL üretimi; Modifiye Hodge testi, IMP/EDTA Kombine Disk testi ve IP/IPI E MBL E test (BIOMERIEUX France) test ile değerlendirildi.

Modifiye Hodge testi için MHA üzerine bir gece inkübasyona bırakılmış olan *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland' a göre hazırlanmış süspansiyonun ekimi yapıldı. Plak kurduktan sonra merkeze IMP diski yerleştirildi. E test ile imipenem ve/veya meropenem MİK değerleri belirlenerek, dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının ekimi karşılıklı olacak şekilde, merkezden periferine doğrusal olarak yapıldı. 35 °C' de 16-18 saat inkübe edildikten sonra imipenem diski inhibisyon çapında görülen yonca yaprağı şeklindeki bozulma MBL üretimi pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı (114).

IMP/EDTA Kombine Disk testinde MBL enzim inhibitörü olarak EDTA kullanıldı. IMP/EDTA Kombine Disk testi için; 18,61g disodium EDTA.H₂O tozu (MERCK, Darmstadt, Almanya) 100 ml' lik steril distile suda çözülerek, pH 8.0' e ayarlandı, +4°C' de muhafaza edildi. MHA plağı üzerine *P. aeruginosa* izolatlarının ekimi yapıldı. Plağın bir yarısına 25 mm aralıkla iki adet IMP diski yerleştirildi. Bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olan 0,5 M EDTA solüsyonundan 10µl pipetle damlatılarak diskin solüsyonu absorbe etmesi sağlandı. 35 °C' deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP/EDTA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, IMP diski etrafındaki inhibisyon zon çapından ≥ 7 mm olması MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı (113).

MBL E testi, bir tarafında 4–256 µg/ml imipenem (IP), diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 1–64 µg/ml imipenem (IPI) içeren MBL E test şeritleri (IP/IPI E test) şeritleri kullanıldı. *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanarak, CLSI önerilerine göre MHA plaklarına ekildi. IP/IPI E test şeritleri plaklara yerleştirildi. 35 °C' deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP için bulunan MİK değeri, IMP/EDTA için bulunan MİK değerine oranlandı. IP/IPI E testinin imipenem + EDTA kısmında imipenem konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu (4 g/mL) sabittir. Üretici firmanın önerilerine göre IMP için bulunan MİK değeri, IMP/EDTA için bulunan MİK değerine oranlandı. Buna göre MİK değeri doğrudan strip üzerinde µg/ml değeri olarak inhibisyon sonunun bittiği noktada okunmaktadır. İki reaktif tarafında elde edilen ≥ 8 MİK oranı veya fantom zonu veya heriki elipsdeki deformasyon saptanan izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı (112, 174).

4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik Bilgiler

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi' de 2009-2013 yılları arasında çeşitli kliniklerden ve servislerden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve *P. aeruginosa* izole edilen toplam 100 izolat çalışmaya alınmıştır.

İzolatların klinik örneklerle göre dağılımları incelendiğinde *P. aeruginosa* izolatları en sık (%30) yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. Bu izolatların %26.72 idrar , %19.8 trakeal aspirat, %18.8 balgam, %14.9 yara, %5.9 kan, %5 sürüntü, %4 boğaz, %3 aspirasyon mayi, %2 BOS olarak belirlenmiştir. Bu materyallerin çoğunluğu yoğun bakım ünitesinden olmak üzere çeşitli servislerden gönderilmiştir.

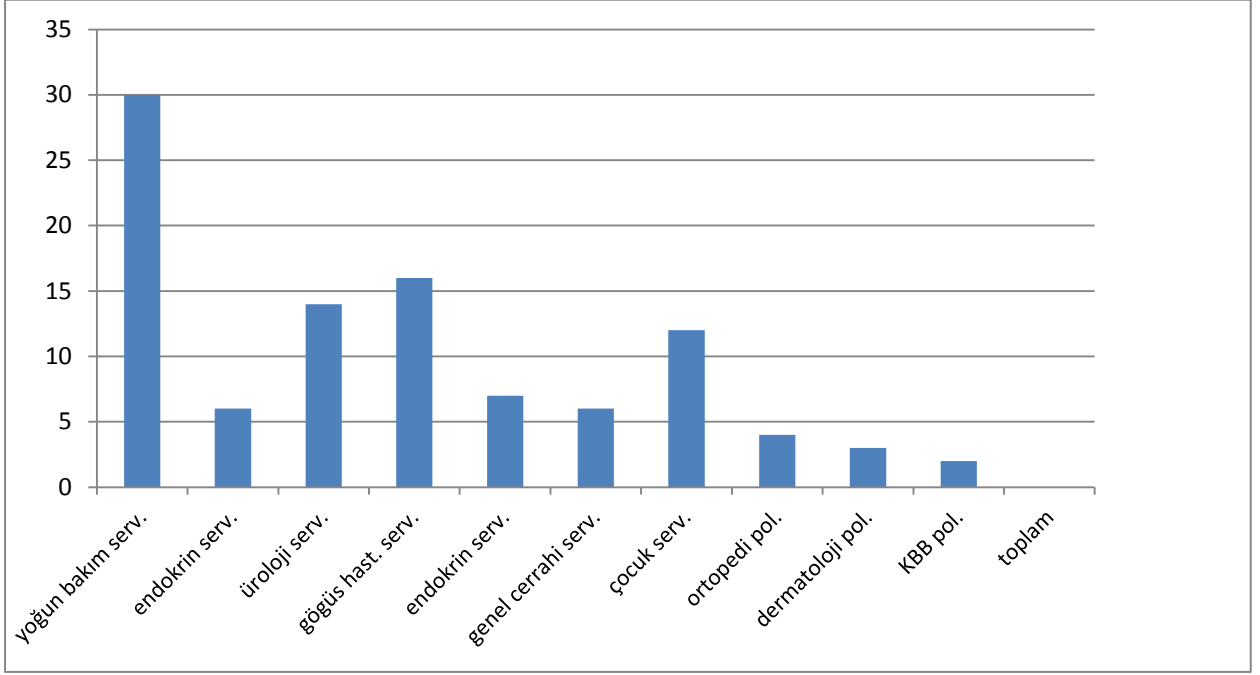
İzolatların klinik örneklerle göre dağılımları Tablo 5' te gösterilmiştir.

Tablo 5. *P. aeruginosa* 'nın izole edildiği klinik örneklerin dağılımı

Örnek tipi	n	%
Trakea	20	19.8
Balgam	19	18.8
İdrar	27	26.7
Boğaz	4	4.0
Kan	6	5.9
Yara	15	14.9
BOS	2	2.0
Aspirasyon mayi	3	3.0
Sürüntü	5	5.0
Total	100	100.0

P. aeruginosa izolatlarının 51' i kadın, 49' u erkek olmak üzere çalışılmıştır. Bu hastaların yaşları 1-87 arasında olup yaş ortalaması 35 ± 2.8 olarak saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının üretildiği hastalar yaşlarına göre sınıflandırıldığında; 0-5 yaş, 5-14 yaş ve 14-50 yaş ve 50 yaş ve üzeri olarak 4 gruba ayrılmıştır. Buna göre *P. aeruginosa* izolatlarının görülme sıklığı 0-14 yaş arası çocuklarda %38 olarak en fazla oranda bulunmuştur (Tablo 6).

P. aeruginosa izolatların klinikler arası sıklığının değerlendirildiği çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatları en sık (%30) yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. İzolatların izole edildiği kliniklere göre dağılımı Şekil 1’ de görülmektedir.



Şekil 1. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildiği kliniklere göre dağılımı

Yoğun bakım hastalarının %46.7’ si 50 yaş ve üzeri hastalardan oluşurken, üroloji polikliniği ve servisi hastalarının % 64’ ünü 5-50 yaş arası hastalar, göğüs hastalıkları servisinin % 56.3’ ünü 14-50 yaş ve % 43’ ünü 50 yaş ve üzeri hastalar oluşturmaktadır. Hastaların yaşları ile servislere ve kliniklere dağılımı arasındaki ilişki incelenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna göre; çocuk servisi hastaları ile sadece üroloji servisi hastalarının yaşları arasında yakınlık varken, diğer bölümlerin hastaları ile yaş dağılımları belirgin farklılık göstermiştir. Üroloji polikliniği hastaları ile endokrin polikliniği, enfeksiyon polikliniği, göğüs hastalıkları servisi ve ortopedi polikliniği hastalarının yaş dağılımları belirgin farklılık göstermektedir. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği hastaların yaş aralığı Tablo 6’ da verilmiştir.

Tablo 6. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği hastaların yaş aralığı (%)

	0-5 yaş	5-14 yaş	14-50 yaş	50 yaş ve üzeri
Yoğun bakım S.	36.7	6.7	10	46.7
Üroloji S, P.	28.6	42.9	21.4	7.1
Endokrin S.	0	16.7	33.3	50
Göğüs S.	0	0	56.3	43.8
Dermatoloji P.	0	0	100	0
KBB P.	0	0	100	0
Çocuk S.	75	25	0	0
GenelCerrahi S.	33.3	0	50	16.7
Ortopedi S.	0	0	50	50
Enfeksiyon S.	0	0	57.1	42.9

(S:Servis, P:poliklinik)

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Antibiyotik duyarlılık testlerinin CLSI (2013) kriterlerine göre belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre *P. aeruginosa* izolatlarının %58' i çalışılan tüm antipseudomonal ilaçlara duyarlı iken; seftazidime %7, sefoperazon-sulbaktama %8, sefepime %13, piperasiline %14, piperasilin-tazobaktama %12, imipeneme %9, meropeneme %11, aztreonama %8, amikasinine %8, gentamisine %13, tobramisine %12, netilmisine %19, siprofloksasine %10 oranında direnç saptanmıştır.

P. aeruginosa izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı Tablo 7' de gösterilmiştir.

Kolistin ile beta-laktam antibiyotiklerden imipenem, meropenem, seftazidim, sefepim, sefoperazon-sulbaktam ve piperasilinlerin direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Yine beta-laktam antibiyotiklerin kendi içindeki direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışılan 100 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı Tablo 6' da gösterilmiştir.

İmipenem ve meropenem için bulunan direnç oranlarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Yine amikoglikozitler için bakıldığında; amikasin, tobramisin, gentamisin ve netilmisin için bulunan oranlarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 7. 100 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
İmipenem	91	(91)	9	(9)
Meropenem	89	(89)	11	(11)
Aztreonam	92	(92)	8	(8)
Seftazidim	93	(93)	7	(7)
Sefoperazon-sulbaktam	92	(92)	8	(8)
Sefepim	87	(87)	13	(13)
Piperasilin-tazobaktam	88	(88)	12	(12)
Piperasilin	86	(86)	14	(14)
Amikasin	92	(92)	8	(8)
Tobramisin	88	(88)	12	(12)
Gentamisin	87	(87)	13	(13)
Netilmisin	81	(81)	19	(19)
Siprofloksasin	90	(90)	10	(10)
Kolistin	100	(100)	0	(0)

P. aeruginosa izolatlarında duyarlılık oranı %100 olan kolistin en etkin antibiyotik olarak görülmüştür. Kolistin dışında en az direnç seftazidimde belirlenirken bunu amikasin, sefooperazon-sulbaktamın ve aztreonamın izlediği belirlenmiştir. İzolatların %8' inin en az üç antipseudomonal ilaç grubuna dirençli (MDR) olduğu saptanmıştır. Çoklu ilaç dirençli bu 8 izolatın 2' sinde MBL enzim üretimi saptanmıştır. MBL enzim üretiminin oranının çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerde daha yüksek olduğu saptanmıştır.

100 *P. aeruginosa* izolatının 9' unda disk difüzyon metodu ile karbapenem direnci saptanmış ve bu direnç, imipenem ve meropenem E test ile doğrulandı. İmipenem E test ile izolatların 7' si dirençli (MİK ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), 2' si orta derecede dirençli (MİK: 8-12 $\mu\text{g/ml}$) olarak bulundu. Orta derecede direnç belirlenen ve göre MİK ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ olan bu 2 izolat CLSI (2013) standartlarına göre imipenem dirençli olarak kabul edilmiştir.

Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatın 3' ü trakeal aspirat, 2' si balgam, 2' si idrar, 1' i boğaz ve 1' i yaradan izole edilmiştir. Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının izole edildikleri klinik örneklerle ve servislere dağılımları Tablo 8 ve Tablo 9' da gösterilmiştir.

Tablo 8. Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının örnek tipine göre dağılımı

Örnek	Sayı	(%)
Trakeal aspirat	3	(33.4)
Balgam	2	(22.2)
İdrar	2	(22.2)
Boğaz	1	(11.1)
Yara	1	(11.1)
Toplam	9	(100)

Tablo 9. Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının kliniklere göre dağılımı

Örnek	Sayı	(%)
Pediyatri Yoğun Bakım	3	(33.4)
Yoğun Bakım	2	(22.2)
Üroloji Servisi	1	(11.1)
Endokrin Servisi	1	(11.1)
Göğüs Hastalıkları Servisi	1	(11.1)
Çocuk Cerrahi Servisi	1	(11.1)
Toplam	9	(100)

Karbapenemlere dirençli dokuz *P. aeruginosa* izolatının diğer antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının karbapenem dışı antibiyotiklere duyarlılığı

Antibiyotik	Duyarlı	Dirençli
	Sayı (%)	Sayı (%)
Seftazidim	6 (66.7)	3 (33.3)
Sefepim	3 (33.3)	6 (66.7)
Aztreonam	4 (44.4)	5 (55.6)
Piperasilin	3 (33.3)	6 (66.7)
Piperasilin/tazobaktam	4 (44.4)	5 (55.6)
Amikasin	5 (55.6)	4 (44.4)
Gentamisin	4 (44.4)	5 (55.6)
Tobramisin	1 (11.1)	8 (88.9)
Netilmisin	1 (11.1)	8 (88.9)
Siprofloksasin	3 (33.3)	6 (66.7)
Sefoperazon/sulbaktam	4 (44.4)	5 (55.6)
Kolistin	9 (100)	0 (0)

4.3. Disk İndüksiyon Testi Sonuçları

P.aeruginosa izolatlarında İBL üretimi disk indüksiyon yöntemiyle araştırılmıştır. İzolatların %86' sı İBL pozitif, %14 'ü İBL negatif olarak saptanmıştır (Resim 1, 2).



Resim 1. İBL pozitif *P. aeruginosa* izolatu

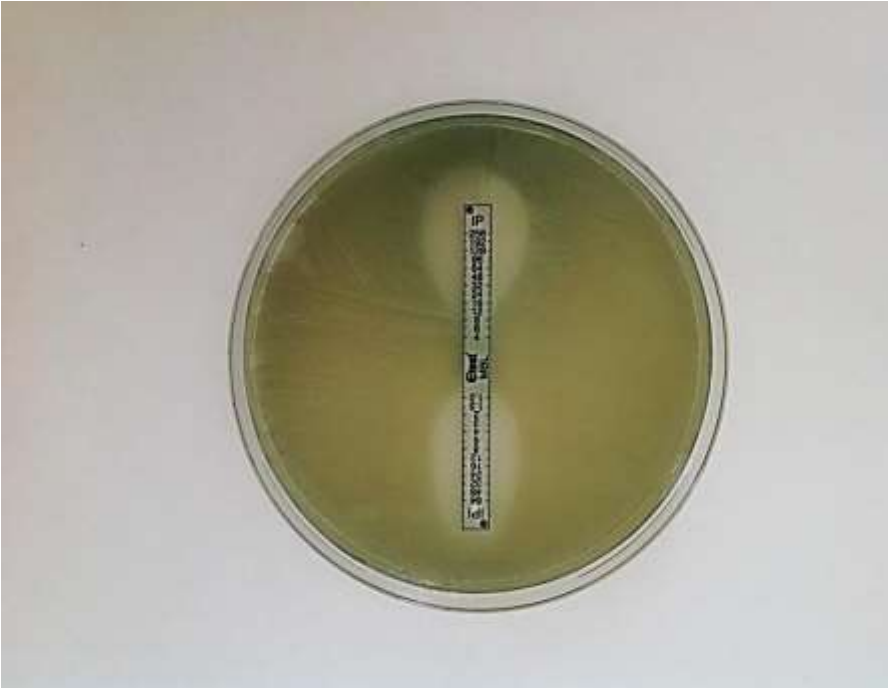
İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarının renk oranı sırasıyla yeşil, mavi ve sarı için %74, %20 ve %6 olarak bulunmuştur. İBL pozitifliği ile renk arasındaki ilişki araştırıldığında anlamlı bulunmuş olup ($p<0.05$), İBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarında yeşil renkli pigment oranı %68.9, İBL üretmeyen *P. aeruginosa* izolatlarında yeşil renkli pigment oranı ise %31.1 olarak saptanmıştır. Ayrıca karbapenem dirençli izolatların çoğunun yeşil renkli pigment ürettiği saptanmıştır.

4.4. MBL E Test, Kombine Disk Testi ve Modifiye Hodge Testi Sonuçları

P.aeruginosa izolatlarında MBL üretimi üç farklı fenotipik yöntemle araştırılmıştır. MBL E testi ile karbapenem dirençli 9 izolattan 2 izolatta MBL üretimi pozitif, 7 izolatta MBL üretimi negatif olarak saptanmıştır (Resim 3, 4).

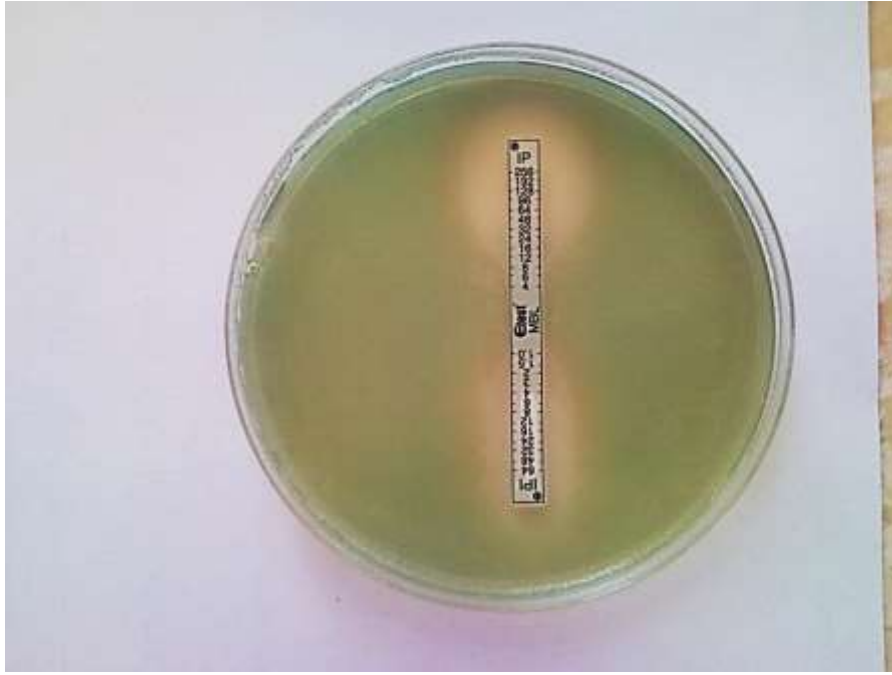


Resim 2. İBL negatif *P. aeruginosa* izolatı



Resim 3. MBL E testi ile MBL pozitifliği

MBL E testi ile MBL pozitif belirlenen 2 izolat, Kombine Disk testi ile de pozitif olarak saptandı. MBL E testi ile MBL negatif belirlenen 7 izolat, Kombine Disk testi ile de negatif olarak saptanmıştır (Resim 5, 6).



Resim 4. MBL E testi ile MBL negatifliği

Kombine Disk testi ile MBL üretimi pozitif saptanan 2 izolatın IMP/EDTA ve IMP diski inhibisyon zon çapları arasındaki fark; birinci izolatta 19 mm iken ikinci izolatta 8 mm olarak ölçülmüştür (Tablo 11).

Kombine Disk testi ile MBL negatif belirlenen 7 izolatta inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 1-6 mm arasında değiştiği saptanmıştır.

Tablo 11. MBL E test ve Kombine Disk testi ile MBL pozitif bulunan iki *P. aeruginosa* izolatının test sonuçları

	MBL E test (MİK)		MBL Kombine Disk testi(zon çapı)	
	IMP	IMP/EDTA	IMP	IMP/EDTA
1 nolu MBLpozitif izolat	12 µg/ml	1 µg/ml	9mm	28mm
2 nolu MBLpozitif izolat	9 µg/ml	1 µg/ml	11mm	19 mm

Modifiye Hodge testi ile karbapenem dirençli 9 izolattan 1'i MBL pozitif, 8'i MBL negatif olarak saptanmıştır (Resim 7, 8). Her üç testle MBL pozitif saptanan 1 izolat ile MBL E test ve Kombine Disk testi ile MBL pozitif saptanan 1 izolat, MBL üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir.



Resim 5. Kombine Disk testi ile MBL pozitifliği.



Resim 6. Kombine Disk testi ile MBL negatifliği



Resim 7. Modifiye Hodge testi ile MBL pozitifliği



Resim 8. Modifiye Hodge testi ile MBL negatifliği

Karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatları içerisinde, MBL pozitif izolatların oranı %22.2 olarak belirlenirken, tüm izolatlar içinde MBL oranı %2 olarak belirlenmiştir.

MBL enzimini saptamada kullanılan üç fenotipik yöntemin sonuçları Tablo 12’ de gösterilmiştir.

MBL E Test, Kombine Disk Testi ve Modifiye Hodge testlerinin birbirleriyle uyumu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Uyum (%) : $a+b/c \times 100$

- a: Her iki test ile pozitif sonuç veren izolat sayısı: 1
- b: Her iki test ile negatif sonuç veren izolat sayısı: 7
- c: Toplam izolat sayısı: 9

Buna göre; MBL E test ile Kombine Disk testi birbiriyle uyumu %100,

MBL E testi ile Modifiye Hodge testinin birbirleriyle uyumu %88.8,

IMP/EDTA Kombine Disk testi ile Modifiye Hodge testinin birbirleriyle uyumu %88.8 olarak belirlenmiştir.

Tablo 12. Karbapenemlere dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatında ve standart suşta fenotipik testlerle MBL tespit sonuçları

	Fenotipik Yöntemler		
	Modifiye Hodge testi (%)	Kombine Disk testi (%)	E test (%)
Pozitif	1 (%11.1)	2 (%22.2)	2 (%22.2)
Negatif	8 (%88.9)	7 (%77.7)	7 (%77.7)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (Negatif kontrol)	Negatif	Negatif	Negatif

MBL pozitif 2 izolatın karbapenem dışındaki antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 13’te gösterilmiştir. Buna göre MBL pozitif 1. izolat sefepim, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, tobramisin ve netilmisine dirençli iken 2. izolat seftazidim, sefepim, piperasilin/tazobaktam, gentamisin tobramisin, netilmisin ve sefoperazon-sulbaktama dirençli olarak saptanmıştır. MBL pozitif iki izolat yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların trakeal aspiratından izole edilmiştir.

Tablo 13. E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki *P. aeruginosa* izolatın diğer antibiyotiklere duyarlılığı

Antibiyotik	1 Nolu MBL pozitif izolat		2 Nolu MBL pozitif izolat	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Seftazidim	+	-	-	+
Sefepim	-	+	-	+
Aztreonam	+	-	+	-
Piperasilin	-	+	-	+
Piperasilin/tazobaktam	-	+	-	+
Amikasin	+	-	+	-
Gentamisin	-	+	+	-
Tobramisin	-	+	+	-
Netilmisin	-	+	-	+
Siprofloksasin	+	-	+	-
Sefoperazon/sulbaktam	+	-	-	+
Kolistin	+	-	+	-

5. TARTIŞMA

Gram negatif bakteriler arasında en sık fırsatçı enfeksiyon ajanı *P. aeruginosa*'dır. Ayrıca *P. aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarından nozokomial pnömoni, üriner enfeksiyon, yara enfeksiyonları ve septisemilerde en sık izole edilen nonfermente bakteridir. Özellikle hastane enfeksiyonlarında birçok antibiyotiğe karşı hızla geliştirdikleri için çoğul ilaç direnci ile güncel bir sorun olarak önemini sürdürmektedir (180).

Ülkemizde ve yurt dışında *P. aeruginosa*'larda antibiyotik direnci ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Türkiye' de yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarının en sık izole edildikleri örnekler idrar, solunum yolu, yara ve kan örnekleri olarak bildirilmiştir (2, 80, 166, 182). Yine ülkemizde yapılan çalışmaların çoğunda *P. aeruginosa* izolatları en sık yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir (81).

Hastanemizde daha önce *P. aeruginosa*'nın klinikler arasındaki sıklığı, antibiyotik direnç oranları, indüklenebilir betalaktamaz ve metallobetalaktamaz sıklığı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Yurt dışında ve ülkemizde yapılan çalışmaların çoğunda olduğu gibi çalışmamızda da *P. aeruginosa* izolatları en sık yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. MDR izolatların çoğu yoğun bakım hastalarından izole edilmiştir. Yapılan çalışmaların bir kısmında en sık örnek tipi idrar iken bir kısmında trakeal aspirat olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise idrar birinci sıklıkta, trakeal aspirat ikinci sıklıkta belirlenmiştir. MDR izolatların çoğu yoğun bakım hastalarının trakeal aspiratından izole edilmiştir. Yine MBL oranının yoğun bakım hastalarında daha yüksek olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının sıklığı ve ayrıca dirençli izolatların yüksek oranda görülmesi açısından entübasyon tüpü, idrar kateteri gibi girişimlerin daha fazla olduğu yoğun bakım ünitelerinin diğer servislere göre daha riskli olduğu düşünülmüştür. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması, antibiyotik direnç profilinin sürekli izlenmesi ve doğru antibiyotik kullanımının önemli olduğu düşünülmüştür.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) 2011- 2012 yılı verileri karşılaştırıldığında *P.aeruginosa* izolatlarının direnç oranları piperacillin/tazobactam için %2.8' den %17.4' e, seftazidim için %8.2' den %15.2' ye, imipenem/meropenem için %12' den %19.2' ye, siprofloksasin için %12.6' dan %20.6' ya, gentamisin için %6.5' ten %11.9' a ve MDR için %4' ten %13' e yükseldiği rapor edilmiştir (116).

Bu veriler, *P. aeruginosa*' ların bir yıl içindeki antibiyotik direnç oranlarındaki artışın önemli ölçüde olduğunu göstermektedir.

ABD' de 29 laboratuvarın katıldığı 1999-2003 yılları arasındaki dört yılı kapsayan 52.637 *P. aeruginosa* izolatının değerlendirildiği bir çalışmada imipenem direnci %14; seftazidim %13; sefepim %10; piperasilin %16; piperasilin/tazobaktam %11; siprofloksasin %31; amikasin %7; gentamisin %19 ve tobramisin direnci %13 olarak bildirilmiştir (33).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda direnç oranları bildirilmiştir. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Hastanesi' nde yapılan çalışmada (Şahin ve arkadaşları); imipeneme %12, siprofloksasine %13, piperasiline %14, amikasine %17, seftazidime %17, aztreonama %21, gentamisine %29 ve netilmisine %40 oranında direnç saptamışlardır (31).

Yine Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' nde 2011'de yapılan 100 *P. aeruginosa* suşun değerlendirildiği bir çalışmada arasında direnç oranları sefepime %60, seftazidime %45, gentamisine %23, imipeneme %18, siprofloksasine %13, piperasiline %11, piperasilin-tazobaktama %8, amikasine %7 olarak saptanmıştır (67).

Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi' nde 255 *P. aeruginosa* suşunun değerlendirildiği bir çalışmada (Cesur ve ark.) antibiyotik duyarlılıkları; aztreonam %48.8, seftazidim %45.1, seftriakson %17.7, sefepim %36.7, sefotaksim %20.8, imipenem %61.6, meropenem %51.7 olarak saptanmıştır (78).

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan 40 suşun değerlendirildiği çalışmada (Fidan ve ark.) siprofloksasine %15, amikasine %18, piperasilin/tazobaktama %25, sefoperazon/sulbaktama %23, imipeneme %15, meropeneme %20, seftazidime %23 direnç saptamışlardır (57).

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi (Eyigör ve ark.) çeşitli klinik örneklerinden izole edilen toplam 94 *P. aeruginosa* suşunun değerlendirildiği çalışmada amikasine %1, siprofloksasine %16, imipeneme %3, gentamisine %4, piperasiline %5, seftazidime %11, sefepime %13, aztreonama %14 oranında direnç saptamışlardır (163).

Atatürk Üniversitesi Mareşal Çakmak Askeri Hastanesinde çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 92 *P. aeruginosa* suşunun değerlendirildiği bir çalışmada direnç oranları amikasin için %3, gentamisin için %16, tobramisin için %8, seftazidim için %15,

imipenem için %14, aztreonam için %12, netilmisin için %11, siprofloksasin için %9 olarak bulunmuştur (2).

Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarının %58' i çalışılan tüm antipseudomonal ilaçlara duyarlı iken; imipeneme %9, meropeneme %11, aztreonama %8, seftazidime %7, sefoperazon-sulbaktama %8, sefepime %13, piperasiline %14, piperasilin-tazobaktama %12, amikasine %8, gentamisine %13, tobramisine %12, netilmisine %19, siprofloksasine %10 oranında direnç saptanmıştır. Hastanemizde *P. aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal direnç oranları ülkemizdeki diğer çalışmalara benzer olarak belirlenmiştir. En etkili antibiyotik %100 duyarlılık oranıyla kolistin olarak belirlenmiştir. Kolistin dışında az direnç, beta-laktam antibiyotiklerinden seftazidimde; aminokoglikozitlerden amikasinde belirlenmiştir.

P. aeruginosa çeşitli direnç mekanizmalarıyla antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Kromozomal ve plazmid kaynaklı betalaktamazların üretimi, antibiyotik hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılması başlıca direnç mekanizmalarıdır (93). Antibiyotik tedavisi sırasında direnç geliştirme mekanizmalarından biri AmpC indüklenebilir kromozomal betalaktamaz ve OXA türü kromozomal betalaktamaz enzimlerini üretmesidir. Özellikle sefalosporinler ve imipenem tarafından üretimi indüklenen bu enzimlerin dereprese mutant türler tarafından yoğun olarak üretilmesi sonucu tüm sefalosporinler ve aztreonama dirençli hale gelmektedir (175). İndüklenebilir betalaktamazlar, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* ve *Morganella* türleri ile *P. aeruginosa* ve diğer nonfermentatif gram negatif bakteriler tarafından yalnızca verilen antibiyotiğe maruziyet sırasında salınan enzimlerdir. Normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenen enzim, ortamda bulunan bir indükleyicinin etkisi ile sentezlenmeye başlar. Farklı beta-laktam antibiyotiklerin betalaktamazları indükleme yetenekleri de farklıdır. Normalde indüksiyon etkisi geçici olup, indükleyicinin etkisi ortadan kalkınca tekrar bazal düzeye döner. Ancak, bu tür betalaktamazları üreten bakterilerde esas sorun, betalaktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır. Üçüncü kuşak sefalosporinlerle tedavi sırasında dereprese mutantların seçilme olasılığı %20-40 civarındadır (126). Üçüncü kuşak sefalosporinlerin ve diğer beta-laktamların yaygın kullanımı *P. aeruginosa* suşlarında indüklenebilir kromozomal AmpC betalaktamaz aracılığıyla ortaya çıkan direncin insidansını önemli oranda arttırmaktadır.

Özellikle antibiyotik kullanımının çok fazla olduğu YBÜ' de stabil derepresyona bağlı direnç, sadece beta-laktam/betalaktamaz inhibitör kombinasyonlarına ve monobaktamlara değil, aynı zamanda aşırı betalaktamaz üretimine yol açan bu mutasyonlar bakteri dış membranında porin kaybına neden olarak, karbapenemlere dirençli mutant suşların seleksiyonunu kolaylaştırmaktadır (136).

Yurtdışında ve ülkemizde İBL üretimiyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yurtdışında 2006 yılında yapılan 66 *P. aeruginosa* suşunun değerlendirildiği bir çalışmada İBL oranı %98.5 olarak belirlenmiştir (120). Yine yurtdışında yapılan bir başka çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarında İBL oranı %72 olarak belirlenmiştir (184).

Gülay ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 150 *P.aeruginosa* suşun %61.3' ünde İBL saptamışlardır (144).

Çelik ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hastane infeksiyonu tanısı almış hastalardan alınan çeşitli örneklerden izole edilen 50 *P. aeruginosa* suşunda direkt indüksiyon yöntemiyle İBL varlığı araştırılmış ve bu 50 suşun 41'inde (%82) oranında İBL saptanmıştır (129).

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2002-2003 yıllarında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 108 *P. aeruginosa* indüklenebilir betalaktamaz aktivitesi %65 olarak bulunmuştur (146).

Ekşi ve ark. 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada İBL oranını %59.2 olarak saptamışlardır (193).

İmipenem ve sefoksitin güçlü indükleyici iken sefoksitin indüklediği enzimle hızla parçalanır, imipenem ise enzimin etkisine dayanıklı olduğundan tedavide sorun oluşturmaz. Üçüncü kuşak sefalosporinler AmpC betalaktamazları için zayıf indükleyicidir, enzim yüksek düzeyde salgılanmadığı sürece sorun oluşturmazlar. Dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim ise sefalosporinler arasında özellikle AmpC betalaktamazlarına karşı etkilidir (175,178). Basit tarama testleri ile İBL pozitif bulunan *P. aeruginosa* izolatlarının etken oldukları infeksiyonların tedavisinde tek başına 3. kuşak sefalosporinlerin ve monobaktamların kullanımından kaçınılmalıdır. Aksi takdirde indükleyici etki ile karbapenemler dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişebileceği konusunda klinisyenler bilgilendirilmelidir (117, 133, 135).

Hastanemizde daha önceki yıllarda, *P. aeruginosa* izolatlarında İBL sıklığıyla ilgili araştırma yapılmamıştır. Çalışmamızda disk indüksiyon yöntemi ile *P. aeruginosa* izolatlarının %86'sında İBL üretimi saptanmıştır. Bu oran yurt dışı çalışmalarındaki İBL oranlarına paralel iken, ülkemizde yapılan birçok çalışmadan daha yüksek bulunmuştur. Hastanemizdeki İBL oranının yüksek oranda pozitif olması nedeniyle tedavide İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile, *P. aeruginosa* izolatlarının bu özellikte olduğu kabul edilmelidir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç gelişebileceğinden; bu izolatların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması ve bu konuda klinisyenlerin bilgilendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bununla birlikte seftazidim, sefepim veya piperasilin/tazobaktam gibi antibiyotiklerin duyarlı olmasına rağmen ampirik tedavide tek başlarına kullanılması İBL üretimini indükleyeceğinden, diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının, hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisi için doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür.

Ayrıca çalışmamızda; İBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarında yeşil renkli pigment oranı %68.9, İBL üretmeyen izolatlarda ise %31.1 olarak belirlenmiştir. Karbapenem dirençli izolatların çoğunun yeşil renkli pigment ürettiği tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar; *P. aeruginosa*' ların ürettiği pigment rengi ile antibiyotik direnci arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bu görüşün farklı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Yurtdışında ve ülkemizde *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimi çeşitli fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemlerle belirlenerek sonuçları karşılaştırılmıştır.

Modifiye Hodge testini geliştiren Lee ve arkadaşlarının moleküler yöntem kullanarak 2001 yılındaki çalışmasında 493 *P. aeruginosa* izolatında Modifiye Hodge testinin duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü ise %88 olarak belirlemişlerdir (187). Ancak 2003 yılında 39 *P. aeruginosa* izolatının değerlendirildiği çalışmada bu testin duyarlılığında düşüş saptamışlardır (114). Son olarak 2008 yılındaki çalışmasında ise, imipeneme dirençli 415 klinik *P. aeruginosa* izolatında Modifiye Hodge testini 117 izolatta pozitif bulurken, MBL direnç genleri PCR ile sadece 45 izolatta saptanmıştır (185).

Yan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada Kombine Disk yöntemi ile imipeneme dirençli pseudomonaslarda %86.7 oranında MBL pozitifliği saptamış ve testin duyarlılığının %70 olduğunu belirtmişlerdir (123).

Jesudasan ve arkadaşları ise imipeneme dirençli gram negatif nonfermente bakterilerde MBL pozitifliğini %56 oranında bulduklarını bildirmiş, karşılaştırma yapıldığında ise imipenem-EDTA Çift Disk Sinerji testinin Modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (119).

İtalya’ da yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %12.6’ sında E-test ile MBL pozitifliği bulunmuştur (150).

Düzce Tıp Fakültesi Hastanesi’ nde yapılan çalışmada çeşitli klinik örneklerden alınan toplam 100 *P. aeruginosa* suşunun 18’ i imipenem dirençli saptanırken, bunların 5 (%28)’ inde MBL varlığı tespit edilmiştir. Bunların 4’ ü yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. MBL varlığını saptamada E test yöntemi kullanılmıştır (67).

Şişli Etfal Hastanesi’ nde 2003’ te yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* izolatları prospektif olarak toplanmıştır. Farklı hastalardan izole edilen 27 suş değerlendirilmiştir. MBL, E test yöntemiyle saptanmış ve 27 suştan 17’ sinde MBL pozitif bulunmuştur (173).

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları bölümünde 2008’ de yapılan bir çalışmada arasında yoğun bakım ünitesinde hastalardan alınan kültür örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen çoğul dirençli 43 *Pseudomonas spp.* suşunda MBL üretimi, Modifiye Hodge testi ve Kombine Disk yöntemi ile araştırılmıştır. Kombine Disk yöntemi ile 43 suşun 34’ ünde, Modifiye Hodge testi ile 43 suşun 16’ sında MBL üretimi tespit edilmiştir (192).

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ nın 2005 yılında yaptığı çeşitli klinik örneklerden izole edilen 40 *P. aeruginosa* suşun değerlendirildiği bir çalışmada 40 suşun 2 (%5)’ inde hem Modifiye Hodge testi hem Çift Disk Sinerji testi ile MBL saptanmıştır (57).

Çanakkale Devlet Hastanesi’ nde yapılan bir çalışmada Ocak 2008-2009 arasında yoğun bakım hastalarından izole edilen 108 *P. aeruginosa* suşun 20’ sinde (%18.5) imipenem direnci saptanmış ve Çift Disk Sinerji testi ile dirençli suşların 14’ ü (%70) MBL pozitif olarak bulunmuştur. Tüm pseudomonas suşlarında MBL üretimi ise %13.2 olarak saptanmışlardır. En çok MBL üretimi ise balgamdan elde edilen izolatlarda izlenmiştir (172).

CLSI' da MBL üretimini saptamak için önerilen standart bir test bulunmamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile enzimin rutin olarak saptanması her hastane için uygulanabilir olmadığından MBL enzimi fenotipik olarak, Çift Disk Sinerji testi, IMP-EDTA Kombine Disk testi, MBL E-test ve Modifiye Hodge testi gibi çeşitli yöntemler ile tespit edilebilmektedir (138). Çalışmamızda MBL üretimi MBL E test, Kombine Disk testi ve Modifiye Hodge testi ile saptanmaya çalışılarak testler karşılaştırılmıştır. Bu üç test ile çalışılan ve moleküler yöntemlerle desteklenen çalışmaların çoğunda Kombine Disk testi ve MBL E testin MBL belirlenmesindeki duyarlılık ve özgünlüğünün oldukça yüksek bulunmuştur. Modifiye Hodge testinin ise duyarlılık ve özgünlüğü düşük bulunmuştur. Çalışmamızda, IMP/EDTA Kombine Disk testi ile IP/IPI E test aynı 2 izolatta MBL pozitif sonuç vermiştir. Modifiye Hodge testi ile bu iki izolatin sadece 1' inde MBL üretimi saptanmıştır. Kombine Disk testi, E test ile %100 uyumlu bulunurken, Modifiye Hodge testinin bu iki testle uyumu %88 olarak bulunmuştur. Modifiye Hodge testinin diğer iki test ile pozitif olan 1 izolatta negatif sonuç vermesinin, yorumlamadaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle rutin laboratuvarlarda MBL belirlenmesinde Modifiye Hodge testinin tek başına kullanılması yerine, Kombine Disk testi veya IPI E test ile birlikte destekleyici bir test olarak kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Kombine Disk testinin, E test kadar güvenli, hızlı ve kolay yorumlanabilen ayrıca E teste göre maliyet yönünden çok daha uygun bir test olduğu düşünülmüştür. Rutin laboratuvarlarda karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında IMP/EDTA Kombine Disk testinin, MBL pozitif izolatların hızla saptanmasına ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkin olarak uygulanmasına katkıda bulunacağı düşünülmüştür. *P. aeruginosa*' da karbapenem direnci metallobeta-laktamaz, oksasilineazlar ve antimikrobiyal ilaçlarla tedavisi sırasında OprD porin proteini porin kanallarında daralmaya neden olan hücre duvarı değişiklikleri ile DNA giraz enzim mutasyonları ve MexEF-OprN aktif pompalama sistemi (upregülasyon) nedeniyle olabilmektedir (61, 64, 167, 169, 170,171, 186).

Eflüks pompa sistemi sıklıkla dış membran geçirgenliğinde azalma ile birlikte çalışarak beta-laktam antibiyotikler, kinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, trimetoprim/sulfametoksazol ve aminoglikozidlere direnç neden olabilir (167, 168). Sınıf D genişlemiş spektrumlu oksasilineazların çoğu Türkiye' deki izolatlarda bulunmuştur (111, 125, 127, 130, 133, 139, 140, 141).

Çalışmamızda karbapenem dirençli 9 *P. aeruginosa* izolatının %22.2' sinde MBL üretimi tespit edilmiştir. Tüm izolatlar içinde MBL pozitiflik oranı %2 olarak belirlenmiştir. MBL oranının ülkemizde ve yurt dışındaki birçok çalışmadan düşük saptanmıştır. Karbapenem dirençli ancak MBL negatif saptadığımız izolatlardaki direncin, MBL enzimi dışında fenotipik yöntemlerle belirlenemeyen karbapenamazlara (Örn. OXA-20, OXA-23, OXA-24, OXA-45 gibi karbapenamaz aktivitesi gösteren oksasilinazlar) veya OprD porin proteini kaybıyla birlikte efluks pompa sistemlerine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak bunun doğrulanması için moleküler çalışmaların gerektiği kanaatine varılmıştır.

2006 EARSS raporunda Avrupa'daki *P. aeruginosa* suşlarının %18' inin üç veya daha fazla antipseudomonal ilaca dirençli olduğu belirtilmektedir (194).

Mersin Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın 2002 yılında yaptığı hastane infeksiyon etkeni olarak izole edilen 34 *P. aeruginosa* suşunun değerlendirildiği bir çalışmada MDR oranı %29 olarak bulunmuştur (188).

Antipsödomonal penisilin ve sefalosporinler, betalaktam-betalaktamaz inhibitörleri, aminoglikozidler, tetrasiklinler, kinolonlar, trimetoprim-sulfametoksazol ve karbapenemlerden en az üçüne direnç gösteren bakterilerde çoklu ilaç direnci vardır (5, 131). Çoklu ilaca dirençli (MDR) *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimi ve efluks pompa sistemi ile bakteri hücrelerinde antimikrobiyal ilaçların birikmesi sonucu yeterli konsantrasyona ulaşamaması nedeniyle de olabilmektedir (167, 168). MDR bakterilerde MBL oranı daha yüksektir (151). Çalışmamızda çoklu ilaç direnci saptanan 8 (%8) izolatın 2' sinde MBL enzim üretimi belirlenmiştir. MBL enzim üretiminin çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerde daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Genel olarak MBL üreten *P. aeruginosa*' lar aztreonam dışındaki bütün beta-laktam antibiyotiklere, sefalosporinlere dirençlidirler. MBL üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde bu antibiyotikler kullanılamaz. Ayrıca aminoglikozid direncine neden olan *aacA4* geni ile MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yan yana bulunması aminoglikozid direncine de neden olabilir (112, 124). Ancak çalışmamızda MBL pozitif saptadığımız izolatların her ikisi aminoglikozidlerden amikasine duyarlı olarak belirlenmiştir.

Antipsödomonal tedavide kullanılabilen birçok ilaca karşı son zamanlarda artan oranlarda görülen direnç, karbapenem kullanımını giderek artırmaktadır. Karbapenem kullanımı, karbapenemaz üreten suşların seleksiyonuna yol açacağından endikasyon yoksa karbapenem kullanımından kaçınılmalıdır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında tedavinin, antibiyotik duyarlılık testlerine göre düzenlenmesinin, karbapenemlere direnç belirlendiğinde MBL varlığının fenotipik yöntemlerle taranıp moleküler yöntemlerle doğrulanmasının, enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik yönden önemli olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇ

Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatları en sık yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. En sık idrar, ikinci olarak trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiştir. Karbapenemlere dirençli izolatların çoğu yoğun bakım hastalarının trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarında kolistine direnç saptanmazken, en az direnç beta-laktam antibiyotiklerinden seftazidimde, aminoglikozitlerden amikasinde belirlenmiştir. Hastanemizdeki İBL oranının yüksek (%86) olması nedeniyle tedavide İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile, *P. aeruginosa* izolatlarının bu özellikte olduğu kabul edilmelidir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarında antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması ve bu konuda klinisyenlerin bilgilendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Ayrıca 3. kuşak sefalosporinlerin ve diğer beta-laktamların duyarlı olmasına rağmen ampirik tedavide tek başlarına kullanılması İBL üretimini indükleyeceğinden, diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının, hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisi için doğru bir yaklaşım olacağını düşündürmüştür.

İBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının çoğunun ve karbapenem dirençli izolatların çoğunun yeşil renkli pigment ürettiğinin tesbit edilmesi, *P. aeruginosa*' ların ürettiği pigment rengi ile antibiyotik direnci arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuda başka çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

İzolatların %8' inin en az üç antipseudomonal ilaç grubuna dirençli (MDR) olduğu saptanmıştır. Çoklu ilaç dirençli bu 8 izolatın 2' sinde MBL enzim üretimi belirlenmiştir. MBL enzim üretiminin oranının çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Karbapenem dirençli izolatların %22.2' sinde MBL üretimi tespit edilmiştir. MBL belirlenmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerden IMP/EDTA Kombine Disk testinin, E test kadar güvenli, hızlı ve kolay yorumlanabilen ayrıca E teste göre maliyet yönünden çok daha uygun bir test olduğu düşünülmüştür. Rutin laboratuvarlarda karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında Kombine Disk testinin, MBL pozitif izolatların hızla saptanmasına ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkin olarak uygulanmasına katkıda bulunacağı düşünülmüştür. Modifiye Hodge testinin tek başına kullanılması yerine, Kombine Disk testi veya IPI E Test ile birlikte destekleyici bir test olarak kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32(8):470-85.
2. Kireççi E, Sevinç İ. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. ANKEM Derg 2008; 22; (4) 209-12.
3. Morrison AJ, Jr., Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 1984; 6 Suppl 3: 627-42.
4. Esen Ş, Leblebicioğlu H. Prevalence of nosocomial infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day point prevalence study. Scand J Infect Dis 2004; 36(2);144-8.
5. ANKEM Derg 2011; 25(3);150.
6. Erdem B, Ustaçelebi, Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, 1999; 551-8.
7. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(5);1085-90.
8. Bilgehan H. Fermentasyon yapmayan gram olumsuz bakteriler " H. Bilgehan (ed): Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları " kitabı, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 2000: 422-3.
9. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005: 2587-615.
10. Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli, In: Infectious Diseases (2th ed), Colman J, Powerdyly GW (eds), Toronto, 2004;(2) ;1733-48.
11. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram olumsuz basiller, In: Klinik Mikrobiyoloji, 2. baskı, Barış Kitapevi, İzmir, 1995: 161-78.
12. Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Petteamore, P.K., Epton, M., Laing R. ve Pearson, J. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. BMC Pulmonary Medicine, 2010; 10; 56-66.

13. Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M. Nonfermentative gram negative bacilli and coccobacilli, *Diagnostic Microbiology*. 1992: 386-406.
14. Winn Jr. W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 2006: 6; 303-91.
15. Pitt TL, Simpson AJH. *Pseudomonas* and *Burkholderia spp.* In: Gillespie SH, Hawkey PM, ed(s). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. U.K. : John Wiley and Sons, Ltd; 2006: 2; 427-35.
16. Bilgehan H: *Klinik Mikrobiyoloji Tanı*. Barış Yayınları, İzmir, 2004: 4;466-7.
17. Chan J, Hadley J. The microbiology of chronic rhinosinusitis. results of a community surveillance study. *Ear Nose Throat J*,2001: 80 (3):143-5.
18. Shannon KP, French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother*, 2004: 53 (5): 818-25.
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier. 2008: 6: 333-8.
20. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. *Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria*. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, ed(s). *Jawetz, Melnick & Adelberg' s Medical Microbiology*. USA: The McGraw-Hill Companies. 2007: 24; 263-7.
21. David T.K, Gerald E.W, (Çeviri: Serter D.): *Mikrobiyoloji*. Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 1992: 2;127-8.
22. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 2007; 67 (3):351-68.
23. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Dis* 1998: 4 (4); 551-60.
24. Niall DM, Murphy PG, Fogarty EE, Dowling FE, Moore DP. Puncture Wound Related *Pseudomonas* Infections of the Foot in Children. *Irish Journal of Medical Science* 1997;166 (2):98-101.

25. *Pseudomonas* dermatitis/folliculitis associated with pools and hot tub-Colorado and Maine, 1999-2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000; 49: 1087-91.
26. Rajashekaraiyah KR, Dhawan VK, Rice TW, McCulley D, Kallick CA. Increasing incidence of *Pseudomonas* endocarditis among parenteral drug abusers. Drug and Alcohol Dependence 1980;6(4): 227-30.
27. Eifrig CWG, Scott IU, Flynn Jr HW, Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmol. 2003;110 (9):1714-7.
28. Vahabođlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Topçu A W, Söyletir G, Dođanay M, (eds), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2008: 2175-86.
29. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 229-33
30. Giamarellou H. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. Int J Antimicrob Agents 2000;16: 103-6
31. Şahin İ, Kaya D, Öztürk E, Öksüz Ş, Gülcan A: Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Bazı Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2002: 16 (4):474-6.
32. Şimşek E: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara, 1993: 2; 268-71.
33. Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME, Karlowisky JA, Sahm DF. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004: 48 (7); 2431-6.
34. Kılıçturgay K: Klinik Mikrobiyoloji. Onur Yayıncılık, Bursa, 1993:1;76-9.
35. Fritz H.K, Kurt E.B, Johannes E, Jean L, (Çeviri: Küçüker M.A, Tümbay E, Anđ Ö.): Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1997: 8; 231-2.
36. Stephen H, Gillespie, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology (2 th ed), John Wiley-Sons ltd; 2006: 427-35.
37. Bilgehan H, Serter F: Klinik Mikrobiyoloji. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 1978: 2; 108-15.

38. Pier G, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition, Elsevier, Philadelphia. 2009; 2: 2835- 60.
39. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, W.C. Winn, Philadelphia-New York: Lippincott. 1997: 5. 253-321.
40. Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, et al. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 1999; 28(5) 1128-33.
41. Salyers AA, and D. D. Whitt. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D.C., USA, 1994: 260-8.
42. Ramsey, D.M., Wozniak, D.J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Moleculer Microbiology, 2005: 56;(2) 309–22.
43. Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003:100; 7907-12.
44. Leid, J.G., Willson, C.J., Shirliff M.E., Hasset, D.V., Parsek, M.R. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. The Journal of Immunology, 2005: 175; 7512-8.
45. Donlan, R.M., Costerton, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 2002: 15; 167-93.
46. Costerton JV, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common of persistent infections. Science 1999; 284: 1318-22.
47. Sadvskaya I., Vinogradov E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, A., Filloux, A. High level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol phosphorylated β -(1 \rightarrow 3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology, 2010: 20; (7) 895-904.
48. Saraçlı, M.A. “Quorum sensing” Mikroorganizmalar İletişim mi Kuruyor?. Gülhane Tıp Dergisi, 2006: 48; 244-50.
49. Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ Microbiol 2005; 7(4): 459-71.

50. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol* 2005; 13(1): 27-33.
51. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med* 2010; 12: 1-18.
52. Gera C, Srivastava S. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. *Curr Sci* 2006; 90; (5) 666-76.
53. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; 46 (4); 207-14.
54. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *J Lab Physicians* 2011; 3;(1) 4-11.
55. Suga H, Smith KM. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Bio* 2003; 7(5); 586-91.
56. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Inter J Med Microbiol* 2006; 296; 149-61.
57. Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg* 2005; 19;(2) 68-70.
58. March JC, Bentley WE. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotech* 2004; 15; 495-502.
59. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram negative bacilli: need for international harmonization in terminology, *Clin Infect Dis* 2008; 46;(7) 1121-2.
60. Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96; 11229-34.
61. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 2002; 95 Suppl 41: 22-26.
62. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases* Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 6; 2587-614.
63. Töreci, G.Ü., *Pseudomonas aeruginosa*' nın pigmentleri toksinleri ve enzimleri. II. Ulusal Kükem Kongresi, 1981: 76-91.

64. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36(Suppl 1): S11-S23.
65. Sharer N., Schwarz, M., Malone G., Howarth, A., Painter, J., Braganza, J. Mutations of the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Chronic Pancreatitis. The New England Journal of Medicine, 1998: 339; 645-52.
66. Öztürk C. E, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallobetalaktamaz sıklığı. ANKEM Derg 2011: 25(1);42-7.
67. Wilson W, Sande M. Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2004: 567-78.
68. Vasil ML, Kabat D, Iglewski BH. Structure-activity relationships of an exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1977: 16; 353-61
69. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2003: 47; 1681-8.
70. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1999;(7);517-25.
71. Blondell-Hill E, Henry DA, Speert DP: *Pseudomonas*, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, DC 2007: 9;(1) 734-48.
72. Gilardi GL. *Pseudomonas* and Related Genere. In: Manual of Clinical Microbiology (5th ed), Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds), ASM Press, Washington DC, 1991: 448-57.
73. Bouza E, Munoz P. Monotherapy versus combination therapy for bacterial infections. Med Clin North Am 2000; 84: 1357-89.
74. Halis Akalın. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları ve tedavisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD, Görükle-Bursa XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi KLİMİK 2007.
75. Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone. 1995: (4);212-24.

76. Güven Ö, Ünver D, Özdemir S. ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2008; 38: 112-6.
77. Azık TE, Doğru Ü, Güriz H, ve ark. Çocuklarda *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları. Çocuk Enf Derg 2007; 1: 1-5.
78. Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer beta-laktam antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2002; 32: 203-6.
79. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2004; 34: 33-6.
80. Özdemir M, Erayman İ, Türkdagi H, Baykan M, Baysal B. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009; 23 (3): 122-6.
81. Ersöz G, Otağ F, Bayındır İ, Kandemir Ö. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının meropenem direnci. XXX Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, Antalya 2002: 290-1.
82. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. J Antimicrob Chemother 1995; 36(Suppl A):1-17.
83. White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40;(4). 904-8.
84. Kitzis MD, Acar JF, Gutmann L. Antibacterial activity of meropenem against gram-negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. J Antimicrob Chemother 1989;24 (suppl A):125-32.
85. Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T. Comparison of two carbapenems, SM-7338 and imipenem: affinities for penicillin-binding proteins and its release from these proteins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents and Chemother 1990;34(3):484-6.
86. Jawetz, Melnick and Adelberg. Tıbbi mikrobiyoloji, Prof. Dr. Osman Şadi Yenen (edt), Nobel Tıp kitapevi, İstanbul, 2010:161-2.
87. Pitt BR. CFTR trafficking and signaling in respiratory epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281(1):L13-L15.

- 88.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards M2A7 Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- 89.** Gündüz T, Arısoy A, Algün Ü, Özbakkaloğlu B. *Pseudomonas aeruginosa* şuşlarının aminoglikozidlere in-vitro duyarlılıkları. ANKEM Derg 2004; 18; (4) 224-7.
- 90.** Gilbert D N, Kohlhepp S J, Slama A, et al. Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin and trovafloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 883-92.
- 91.** Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000; 38;(1) 40-43.
- 92.** Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42; (2)128-32.
- 93.** Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998; 27 Suppl 1: 93- 9.
- 94.** Gür D. Hastane İnfeksiyonları etkeni çoklu dirençli Gram-negatif mikroorganizmalar Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2003; 7 (3): 111-7.
- 95.** Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 48 Suppl 1: 59-64.
- 96.** Livermore DM. beta-lactamases: quantity and resistance. Clin Microbiol Infect 1997; 3; Suppl 4: 10-9.
- 97.** A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother 1991; 27 Suppl D:1-50.
- 98.** Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(5);991-6.
- 100.** Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14;933-51.
- 101.** Moellering RC. Meeting the challenges of beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 1993; 31; 8-9.

- 102.** Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended- spectrum β - lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agent Chemother* 1996; 40:2488-93.
- 103.** Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotics resistance. *Clin Microbial Infect*, 2000; 6(Suppl 3); 93–4.
- 104.** Gür D. Betalaktamazların sınıflandırılması. *Flora* 1996; 2: 80-6.
- 105.** Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085-9.
- 106.** Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989: 259-63.
- 107.** Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1: 347-57.
- 108.** Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 40; (11) 4051-5.
- 109.** Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43(1);1-4.
- 110.** Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48;(12) 4654-61.
- 111.** Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A Functional classification scheme for β - lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995: 1211-33.
- 112.** Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2755-9.
- 113.** Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2002; 40;(10) 3798-801.

- 114.** Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk-synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*. *J. Clin. Microbiol.* (<http://dx.doi.org/2003.PMid:14532193/PMCID:25430010.1128/JCM.41.10.4329>)2003;41: 4623-29.
- 115.** Sanders CC, Sanders WE, Jr. beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15; (5) 824-39.
- 116.** The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). EARSS database:2011/2012:Eriřim:<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/Pages/index.aspx>.
- 117.** Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009; 58; (9) 1133-48.
- 118.** Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289; (1036) 321-31.
- 119.** Jesudason M V, Kandathil A J, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-beta-lactamase-production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005; 121; 780–3.
- 120.** Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL, IBL and MBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Zaklad Mikrobiyologii Akademii Podlaskiej w Siedlcach. *Med Dosw Mikrobiol.*2008;60(2);111-9.
- 121.** Nakae T., Nakajima A., Ona T., Saito K., Yoneyama H.: Resistance to beta- lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1999; 43: 1301-1303.
- 122.** Sanders CC. beta-lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14; (5) 1089-99.
- 123.** Yana J J, Wub J J, Tsaia T S, Chuang L C. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 49; 5–11.
- 124.** Walsh T R, Toleman M A, Hryniewicz W, Bennett P M and Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM–2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52; 116–9.

- 125.** Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum beta-lactamases. *Chest* 2001; 119; (2) 391-6.
- 126.** Kovacs K, Yu VL, Antipseudomonal antimicrobial agent therapy. *Drugs Today* 1994; 30; 155-70.
- 127.** Pechere JC, Köhler T. Patterns and modes of β -lactam resistance in *P. aeruginosa*. *Clinical Microbiology Infection* 1999; 5; (suppl 1) 15-8.
- 128.** Bonfiglio G, Iakoupi E, Franchino L, Amicosante G, Nicolletti G. Mechanism of β -lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 42; 697-702.
- 129.** Çelik İ, Cihangiroğlu M, Akbulut A. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında induklenebilir beta-laktamaz sıklığı. *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12(4);284-86.
- 130.** Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. *Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara* 2004: 5-13.
- 131.** McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum, *Am J Infect Control* 2006; 34; (5) 29-37.
- 132.** Gür D. ESBL ve plazmid kaynaklı AmpC β -laktamazlar. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Antalya 2005: 147-51.
- 133.** Bradford PA. What's New in beta-lactamases? *Curr Infect Dis Rep* 2001;3; (1)13-9.
- 134.** Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42; (2) 128-31.
- 135.** Langaee TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44; (3) 583-9.
- 136.** Bal Ç. Beta-laktamazlar: Güncel durum. *Flora* 2003; 8; 111-23.
- 137.** Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47; (8) 2385-92.
- 138.** Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz oranlarının belirlenmesi, *İnfeksiyon Derg.* 2008; 22; (1) 49-52.

- 139.** Toleman A M, Rolston K, Jones N, Walsh RT. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended- spectrum class 2d β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003: 2859-63.
- 140.** Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 1999;5;(11)865-79.
- 141.** Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V et al. Evaluation of the Osiris expert system for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2003: 41; (8) 3712-38.
- 142.** Pellegrino C, Teixeira LM, Carvalho M. et al. Occurrence of a multidrug resistant *P. aeruginosa* Clone in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2002: 2420-4.
- 143.** Gerhard F, Weldhagen F, Laurent Poirel, Partice Nordmann. Ambler Class A extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003: 2385-92.
- 144.** Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir seftazidimazların araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 1996: 10; 329-31.
- 145.** Dumlupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergisi* 2001: 14; (2) 47-56.
- 146.** Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Kan Ü. E, Özbakkaloğlu B. Hastane Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*. 2004: 8; (4) 299-303.
- 147.** Bush K. Metallo- β -lactamases: A class apart. *Clinic Infectious Disease* 1998: (Suppl1); 48-53.
- 148.** Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamases gene bla spm-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004:1406-9.
- 149.** Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2002: 3; 117-27.
- 150.** Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, et al. First countrywide survey of metallo betalactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008: 10; 4023-29.

- 151.** Gales A, Menezes C, Silbert S, Sader S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52: 699-702.
- 152.** Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50; (5) 673-9.
- 153.** Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2005; 43; (8) 3824-8.
- 154.** Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50; (6) 2272-3.
- 155.** Koh TH, Wang GC, Sng LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. *J Clin Microbiol* 2004; 42; (11) 5378-80.
- 156.** Xiong J, Hynes MF, Ye H, Chen H, Yang Y, M'zali F et al. bla(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50; (1) 355-8.
- 157.** Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40; (2) 349-53.
- 158.** Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16 and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac (6')-30/aac(6')-Ib':report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: (12) 4693-702.
- 159.** Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46; (1) 255-8.

- 160.** Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37; (1) 26-32.
- 161.** Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM. In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45;(4) 1249-53.
- 162.** Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2003; 51(2):257-266.
- 163.** Eyigör M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009; 23; (3) 101-5.
- 164.** Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM: blaVIM-2 cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in Korean Hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1053-4.
- 165.** Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM: Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol 2000; 38; 1290-1.
- 166.** Eyigör M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009; 23; (3) 101-5.
- 167.** Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2004; 10; (1) 12-26.
- 168.** Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control 2006; 34;(Suppl 1) 3-10.
- 169.** Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis 1998; 27; (Suppl 1) 32-41.
- 170.** Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49; (2) 479-87.

- 171.** Rice LB, Bonomo RA. The Red Menace: Emerging Issues in Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacilli. *Curr Infect Dis Rep* 1999; 1; (4) 338-46.
- 172.** Arabacı F, Oldacay M. Yoğun Bakım Servisinde Yatan Hastalardan izole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Araştırılması *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.* 2010; 40; (1) 37-40.
- 173.** Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallobetalaktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2004; 34; 248-50.
- 174.** Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qwarnstrom A et al. Evaluation of E test MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2005; 43; (2) 942-4.
- 175.** Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiol Rev* 1995; 8; (4) 557-84.
- 176.** Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41; (Suppl 2) 120-6.
- 177.** Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27; (Suppl 1) 54-63.
- 178.** Gülay Z: İndüklenebilir beta-laktamazlar: Özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi, “Ulusoy S (ed): Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi-2: Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi” kitabında, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2005: 45-69
- 179.** Jawetz, Melnick and Adelberg. Tıbbi mikrobiyoloji, Prof. Dr. Osman Şadi Yenen (edt), Nobel Tıp kitapevi, İstanbul, 2010: 264-5.
- 180.** Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öztürk C.E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Yıllar İçinde İzlenmesi. *ANKEM dergisi* 2006; 20; (3) 152-5.
- 181.** Ersöz G, Otağ F, Bayındır İ, Kandemir Ö, Aslan G, Kaya A. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri *ANKEM Dergisi* 2004; 18; (1) 2831-2.
- 182.** Şenbayrak AS, Topkaya A, Oğuzoğlu N, Küçükercan M, Akın ES, Göktaş P. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17; (4) 465-69.

- 183.** National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. January 2013:Table 2B-1 Vol. 33 M02-A11 and M07-A19 No.1.62-4.
- 184.** Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A. Occurrence of beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. Katedra Mikrobiologii Akademii Podlaskiej w Siedlcach. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Med Dosw Mikrobiol. 2001;53(1):45-51.
- 185.** Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas spp.* in Korea: High prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. Yonsei Med J 2009: 50(3):335-9.
- 186.** Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002: 34:634-40.
- 187.** Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas and Acinetobacter species*. Clin Microbiol Infect 2001;7(2):88-91.
- 188.** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri. ANKEM Dergisi. 2004: 18(1);28-31.
- 189.** Maeda K, Kobayashi Y, Oie S et al. Antimicrobial effects of drugs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Biol Pharm Bull* 2008;31(10):1898-901. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.1898>.
- 190.** Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Infect Dis* 2009;10(9):123.<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-123>.PMid:19664245.
- 192.** Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun Bakımda İzole Edilen *Pseudomonas spp.* Suşlarında Metallobetalaktamaz Sıklığının Araştırılması. ANKEM Derg doi:10.5222/ANKEM.2011: 25; (3) 150-6.
- 193.** Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir betalaktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem. Derg. 2007; 37(3):142-146.
- 194.** Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill 2008; 13(47).

