

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SEFTAZİDİME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SUŞLARINDA PER-1 ENZİMİNİN SINIF 1
İNTEGRONLARLA İLİŞKİSİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞEGÜL OPUŞ

SAMSUN 2009

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SEFTAZİDİME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SUŞLARINDA PER-1 ENZİMİNİN SINIF 1
İNTEGRONLARLA İLİŞKİSİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞEGÜL OPUŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ASUMAN BİRİNCİ

SAMSUN 2009

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan, tez çalışmalarımnda değerli bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, her konuda yardım ve hoşgörülerini ile destek olan, eğitimimde büyük katkısı bulunan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a, Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e, Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, Yrd. Doç. Dr. Çağatay ACUNER'e, eğitimim boyunca bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocaları; Prof. Dr. Hakan LEBLEBİCİOĞLU'na, Prof. Dr. Mustafa SÜNBL'ne, Prof. Dr. Cafer EROĞLU'na, Doç. Dr. Şaban ESEN'e ve diğer hocalarıma, tez çalışmalarımnda tecrübe ve bilgi birikiminden yararlandığım Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a,

Çalışma sürem boyunca ve tezimin tüm aşamalarında yardımlarından dolayı Arş. Grv. Kemal BİLGİN'e, çalışmaktan ve birlikte olmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, destek ve yardımlarını esirgemeyen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD çalışanlarına,

Tüm yaşamım boyunca sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan anne ve babama, hayatımın her aşamasında gösterdikleri sevgi ve fedakarlık için canım kardeşlerim Seçil ve Sevil'e, tanıştığımız ilk günden beri anlayışı, sevgisi ve ilgisi her zaman yanımda olan sevgili eşim Bekir OPUŞ'a, dünya tatlısı biricik oğullarım Bilgehan ve Oğuzhan'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	3
2.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri	3
2.1.3. İdentifikasyonu	4
2.1.4. Epidemiyoloji	5
2.1.5. Patogenez	5
2.1.6. Virulans Faktörleri	6
2.1.6.1. Konak Faktörleri	6
2.1.6.2. Bakteriyel Faktörler	7
2.1.7. Oluşturduğu İnfeksiyonlar	8
2.1.8. <i>P.aeruginosa</i> İnfeksiyonlarının Tedavisi	10
2.1.9. <i>P.aeruginosa</i> 'nın Antibiyotiklere Direnci	11
2.1.9.1. Kazanılmış Direnç	11
2.1.9.2. Aktif Dışa Pompalama Sistemleri	11
2.1.9.3. Dış Membran Porin Defektleri	12
2.1.9.4. Beta-laktamazlar	12
2.2. PER-1 Enzimi	16
2.3. Beta-laktamaz Genlerinin Yayılım Yolları	18
2.3.1. Transformasyon	19
2.3.2. Konjugasyon	19

2.3.3. Transdüksiyon	20
2.3.4. Plazmitler	21
2.3.5. Transpozonlar	21
2.3.6. İntegronlar	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Cihazlar	25
3.1.2. Kimyasal Maddeler	25
3.1.3. Tamponlar	26
3.1.4. Besiyerleri	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının Tiplendirilmesi	27
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	27
3.2.3. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile GSBL Saptanması	28
3.2.4. <i>P. aeruginosa</i> bakteri hücrelerinden DNA ekstraksiyonu	28
3.2.5. PZR Optimizasyonu	29
3.2.6. PZR Yöntemiyle <i>PER-1</i> Geninin Amplifikasyonu	30
3.2.7. Seftazidim Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi	32
3.2.8. İzolatların Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Yöntemiyle Klonal Yakınlıklarının Araştırılması	32
3.2.7. <i>PER-1</i> Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığının Araştırılması	33
3.2.8. <i>PER-1</i> Enziminin Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisinin PZR ile Araştırılması	34
3.2.9. Çalışmada kullanılan istatistik yöntemler	36

4. BULGULAR	
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının İzole Edildikleri Örnek Türleri ve Klinik Servisler	37
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	38
4.3. PZR Optimizasyon Sonuçları	39
4.4. PZR Yöntemiyle <i>blaPER-1</i> Saptanması	41
4.5. PZR Yöntemi ile <i>blaPER-1</i> Taşıdığı Saptanan Suşların Seftazidim MİK Değerleri	41
4.6. <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının Klonal Yakınlıkları	42
4.7. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığı ve Epidemiyolojik Değeri	49
4.8. <i>blaPER-1</i> 'in Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisi	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	62

TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo I	: Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar	14
Tablo II	: Magnezyum klorür optimizasyonu	29
Tablo III	: Primer bağlanma ısı optimizasyonu	30
Tablo IV	: Çalışmada kullanılan primer dizileri	36
Tablo V	: Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar	38
Tablo VI	: <i>blaPER-1</i> ; (+) ve (-) suşlarda antibiyotik direnç profili	42
Tablo VII	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri-I	46
Tablo VIII	: <i>blaPER-1</i> (+) <i>P. aeruginosa</i> suşlarının RAPD-PZR ve İntegron paternleri	47
Tablo IX	: <i>blaPER-1</i> (+) <i>P. aeruginosa</i> suşlarında saptanan RAPD-PZR ve integron paternleri	48

ŞEKİL LİSTESİ

		SayfaNo:
Şekil I	: Beta laktamaz enzimlerinin yapısı	13
Şekil II	:A sınıfı beta-laktamazlar ile PER-1'in evrimsel yakınlığı	17
Şekil III	:Transformasyon ile gen aktarımı	19
Şekil IV	: Konjugasyon ile gen aktarımı	20
Şekil V	: Transdüksiyon ile gen aktarımı	20
Şekil VI	: İntegronların genel yapısı	23
Şekil VIII	: İntegronlara gen kasetlerinin eklenmesi	23
Şekil IX	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri servisler ve Oranları	37
Şekil X	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının elde edildikleri örnek türleri	38
Şekil XI	: Çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliği saptanan <i>P. aeruginosa</i> suşu	38
Şekil XII	: <i>blaPER-1</i> için magnezyum klorür optimizasyonu ile oluşan 924 bp'lik bant profilleri	40
Şekil XIII	: <i>PER-1</i> enzimi için primer bağlanma ısı optimizasyonu	40
Şekil XIV	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarında saptanan 924 bp'lik <i>PER-1</i> gen bölgeleri	41
Şekil XV	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarında saptanan 924 bp'lik <i>PER-1</i> gen bölgeleri	41
Şekil XVI.	: <i>blaPER-1</i> tespit edilen 1-22 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları	43
Şekil XVII	: <i>blaPER-1</i> tespit edilen 25-59 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları	43
Şekil XVIII	: <i>blaPER-1</i> tespit edilen 60-99 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları	44

Şekil XIX	: <i>blaPER-1</i> tespit edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının RAPD-PZR sonuçları ile oluşturulan grup profilleri	44
Şekil XX	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının RAPD-PZR sonuçlarına göre çizilen dendogramı	45
Şekil XXI	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının integron-PZR A paternleri	49
Şekil XXII	: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının integron-PZR B ve C paternleri	50
Şekil XXIII	: 1-56-72 no'lu suşlarda 5'CS ve PER-D primerleri ile gerçekleştirilen PZR ürünleri	51
Şekil XXIV	: 1-56-72 no'lu suşlardan elde edilen 1 kb'lık ürünün kalıp olarak kullanıldığı PER-PZR sonuçları	51

KISALTMALAR

ATCC:	: American type culture collection
BOS:	: Beyin omurilik sıvısı
Bp:	: Baz çifti
CFU:	: Colony forming unit
CLSI:	: Clinical and laboratory standarts institute
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EF-2	: Elongasyon faktör-2
EMB	: Eosine-Methylen Blue
ERIC	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus
GSBL	: Genislemiş spektrumlu beta-laktamaz
IBL	: İndüklenebilir beta-laktamaz
İEO	: İzoelektrik odaklama
MDR	: Multiple drug resistance
MHA	: Mueller hinton agar
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
NNIS	: National nosocomial infections surveillancce system
OprD	: One octapeptide repeat deletion
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PFGE	: Pulsed field jel elektroforez
pH	: Hidrojen iyonu
pI	: İzoelektrik noktası
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RE	: Restriksiyon enzimi
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
UPGMA	: Unweighted pair group method with mathematical averaging
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) çoğunlukla hastane infeksiyonları etkeni olan, yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan önemli bir patojendir. *P. aeruginosa*'da beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarından en sık görüleni beta-laktamaz üretimidir. PER-1 enzimi, sınıf A'da yer alan TEM veya SHV türeviden olmayan bir genişlemiş spektrumlu beta laktamaz türevidir olup özellikle seftazidim direncine yol açmaktadır. PER-1 gibi beta-laktamaz enzimlerini kodlayan direnç genleri integronlar gibi hareketli genetik elementler aracılığıyla bakteriler arasında aktarılabilmektedir.

Bu çalışmada, hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direncine neden olan PER-1 enziminin varlığını göstermek, görülme sıklığını ortaya koymak ve sınıf-1 integronlarla ilişkisini saptayarak yeni oluşacak hastane infeksiyonu olgularını kontrol altına almak hedeflenmektedir.

Seftazidime dirençli 100 adet *Pseudomonas aeruginosa* suşunda PER-1 gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespit edildi. Suşların RAPD-PZR yöntemiyle klonal yakınlıkları belirlendi. PER-1 enzimi taşıyan 40 suшта integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZR ile sınıf-1 integronların varlığı araştırıldı. Farklı RAPD-PZR paternlerini temsil eden suşlarda, *blaPER-1* ve sınıf-1 integronların korunmuş bölgelerine özgü primerler kombine edilerek gerçekleştirilen PZR ile *PER-1* geninin sınıf-1 integronlar ile ilişkisi araştırıldı.

İncelenen suşlarda %40 oranında PER-1 enzimi tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa* suşları arasında saptanan dört ana klonun yüksek prevalanstan sorumlu olduğu RAPD-PZR sonuçları ile ortaya kondu. PER-1 enzimi taşıyan suşlarda %62.5 oranında sınıf-1 integron saptandı ve 2 adet *Pseudomonas aeruginosa* suşunda PER-1 geninin sınıf-1 integronlarla ilişkili olduğu gösterildi. Hastanemizde PER-1 enziminin yaygın olduğu ve bu enzimi üreten birçok suşun "klonal ilişkili" oluşunun horizontal yayılıma işaret ettiği, *blaPER-1*'in sınıf-1 integronlarla ilişkili olmasının bu genin yayılımını hızlandırabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, beta-laktamaz, PER-1, sınıf-1 integron

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is an important pathogen that causes nosocomial infections and highly leads to mortality and morbidity. The most encountered resistant mechanism against beta lactam antibiotics is beta-lactamase production in *P.aeruginosa*. PER-1 enzyme is derived from an extended spectrum beta-lactamase that is non-TEM-, non-SHV-derived in class A and especially causes ceftazidime resistance. The resistance genes that encode beta lactamase enzymes such as PER-1 can be transferred among bacteria by mobile genetic elements such as integrons.

In this study, it is aimed to identify the PER-1-type- beta lactamase enzyme that causes ceftazidime resistance by molecular methods, determine the frequency of the PER-1 enzyme and to get the nasocomial infections under control by determig the relationship between the enzyme and class-1 integrons .

PER-1 gene was sought in 100 ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains by polymerase chain reaction (PCR). The clonal relationship between strains was determined by RAPD-PCR. The existence of class 1 integron was investigated in 40 PER-1 enzyme bearing strains with using primers that are specific to 5' and 3' conserved segments of class-1 integrons by PCR. The association between PER-1 gene and class-1 integrons was investigated with combining primers that are specific for conserved segments of blaPER-1 and class-1 integrons by PCR in representative strains that possess different RAPD-PCR patterns.

PER-1 gene was detected in 40% of the isolates. It is exhibited that four principal clones that were detected in *Pseudomonas aeruginosa* strains were responsible for high prevalence by RAPD-PCR results. Class-1 integron was detected in 62.5% of the PER-1 enzyme bearing strains and association between PER-1 gene and class-1 integrons was shown in 2 *Pseudomonas aeruginosa* strain. We concluded that PER-1 enzyme is common in our hospital and the existence of the clonal relationship between enzyme bearing strains indicates horizontal dissemination, the association between blaPER-1 and class-1 integrons can accelerate dissemination of this gene.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, beta-lactamase, PER-1, class-1 integron

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane infeksiyonlarına neden olan önemli bir patojendir (27). Çoklu direnç gösteren kökenlerin sayısı uygun olmayan antimikrobiyal ilaçların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan infeksiyonların tedavisi ciddi problemler oluşturmaktadır (30).

P. aeruginosa suşları dış membran geçirgenliğinde azalma, aktif pompa sistemlerinin varlığı ve beta-laktamaz enzimlerinin üretimi gibi birçok mekanizma ile beta-laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Klinikte en fazla karşılaşılan direnç diğer gram-negatif bakterilerde olduğu gibi *P. aeruginosa*'da da beta-laktamaz enzimlerinin yol açtığı dirençtir (79). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar klinikte sık kullanılan geniş spektrumlu beta-laktamlarda dirence yol açması nedeniyle en önemli beta-laktamaz gruplarından biridir. GSBL' lar olan sınıf A ve D gibi serin beta-laktamazlar, sınıf B gibi metallo beta-laktamazlar hareketli genetik elementler aracılığıyla kazanılabilen beta-laktamazlar olup beta laktam antibiyotikleri inaktive etmektedirler. Kazanılmış bir enzim olan PER-1 moleküler sınıf A'da yer alan, oksiiminosefalosporinlere direnç oluşturması ve epidemiyolojik çalışmalarda yüksek oranlarda aktarımının gösterilmesi nedeni ile klinik önemi dikkate değer olan bir enzimdir (76). PER-1 ilk kez 1991 yılında Paris'te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış ve 1993 yılında Nordmann ve arkadaşlarınca tanımlanmıştır (74). PER-1 gibi beta-laktamaz enzimlerini kodlayan direnç genleri plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elementler aracılığıyla bakteriler arasında aktarılabilir. PER-1 enzimi sentezleyen bakterilerde klinik tablonun çok daha ağır seyrettiğine işaret eden çalışmalar da mevcuttur (104). İntegronlar bölgeye özgü rekombinasyon mekanizması ile antibiyotik direnç genlerinin kendilerine entegre olmalarını sağlayan doğal ekspresyon vektörleridir. İntegronların yapısındaki gen kasetlerinde bulunan PER-1 tipi beta-laktamazların beta laktam dışında farklı direnç genleri ile beraber eksprese edilebilmesi çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Doğal ekspresyon vektörleri olan integron gibi hareketli genetik elementlerin yapısının aydınlatılması ve PER-1 enziminin integronların içeriğinde yer aldığı

gösterilmesinin; moleküler direnç mekanizmalarının anlaşılmasına, çoklu dirençli etkenlerin neden olduğu tedavi başarısızlığının engellenmesine ve hastane infeksiyonu olgularının kontrol altına alınmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında araştırmamızda hastane infeksiyonu etkeni olan seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim gibi beta laktam antibiyotiklere dirençte rol oynayan *PER-1* enzimini kodlayan gen bölgesinin saptanması, *PER-1* enzimi üreten suşların klonal yakınlıklarının belirlenmesi ve *PER-1* enziminin sınıf-1 integronlarla ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Klinik açıdan önem taşıyan aerob gram-negatif basillerin %10-15'ni nonfermentatif bakteriler oluşturmaktadır. Bu grup içerisinde yer alan *P. aeruginosa* hastane ortamında sık görülen mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olması, birden fazla antibiyotik grubuna farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmesi nedeniyle tedavisinde güçlüklerle karşılaşıl原因 önemli bir bakteridir (69). İlk kez 1882'de Gessard tarafından mavi irin etkeni olarak gösterilmiştir (9).

2.1.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Değişiklik göstermekle birlikte *P. aeruginosa* yaklaşık olarak 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, gram negatif çomaktır. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır. Bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiği nedeniyle çok hareketlidir (7). Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları tarif edilmiştir (9,26).

2.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Aerob solunuma dayalı metabolizmaları olmakla beraber nitratın son elektron alıcısı olarak kullanılmasına bağlı olarak anaerob olarak da üreyebilir (69,58,7). Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde çoğalır ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigment oluşturur. Laboratuvarlarda triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukulatamsı agar, Mueller Hinton Agar (MHA), endo agar ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37 °C'de kolaylıkla üreyebilir fakat 4°C'de üreyemez, 42°C'de üreyebilme özelliği diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasında önemli bir özelliktir (7,11,26,9,103). Klinik ve çevresel örneklerden *P. aeruginosa* izolasyonu ve muhtemel tanısı için asetamid, nitrofurantoin, fenanthrolin ve setrimid gibi inhibitörler içeren pek çok seçici besiyeri kullanılmaktadır. İzolatların çoğu kanlı agarda beta hemolitikdir, tipik metalik parlaklık oluşturur. Mac Conkey agarda, laktoz negatif koloniler şeklinde görülür (26,44). Bu bakteri, katı besiyerlerinde başlıca 3 tip koloni oluşturur. Tip 1 koloniler; yuvarlak, mat yüzeyli,

ortası kabarık, 2-3 mm çapındaki kolonilerdir ve klinik materyallerden üretilen *P. aeruginosa* 'lar daha çok bu tip kolonileri oluştururlar. Tip 2 koloniler; küçük, kabarık, koliform kolonilere benzerdir. Tip 3 koloniler ise R koloni formundadır. Bu formların dışında mukoid, cüce, jelatinöz koloniler de görülebilir (9). *P. aeruginosa* kültürde koloni varyantlarının bir karışımını oluşturabilir ve karışık bir bakteri kültürü izlenimi verebilir. Bu koloni tipleri, farklı biyokimyasal özellik ile enzimatik aktiviteye ve farklı antibiyotik duyarlılık paternine sahip olabilir. Bu karışık koloni varyantları antibiyotik duyarlılık testlerinde sorun oluşturabilir (12,44). Kültürlerin çoğunda, triptofandan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak üzüm benzeri koku oluşturması karakteristik özelliğidir (26).

P. aeruginosa kökenlerinin büyük çoğunluğu bir veya daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, *P. aeruginosa* 'nın tanısı için önemli olan ve bakteri hücrelerinin demir alımında da rolü olan turkuaz mavimsi renkli piyosiyenin pigmentidir. Her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamışsa da, diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları saptanmıştır (7).

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmediğinden glukoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken maltoz, laktoz ve sükroza etki etmez. Oksidaz, katalaz, sitrat, L-arjinin dihidrolaz pozitifken, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir. İndol ve hidrojen sülfür oluşturmaz, metil-kırmızısı ve Vogler-Proskauer testi ise olumsuzdur. Nitratlardan gaz oluşturur, jelatini hidrolize eder ve potasyum siyanüre dirençlidir (26,84).

2.1.3. İdentifikasyon

P. aeruginosa izolasyonunda alınacak örnek infeksiyonun yerine göre değişmek üzere balgam, idrar, püü, beyin omurilik sıvısı, yanık sürüntüleri vb. olabilir. *P. aeruginosa* 'yı kültürde üretmek amacıyla %5 koyun kanlı agar ve seçici bir besiyeri olan MacConkey agar kullanılmaktadır (9). Koloni morfolojisi, pigment oluşumu ve üzüksü kokusuyla kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Koloniler genellikle basık, R koloni formundadır. Ancak S koloni veya M koloni formunda koloni varyantları da oluşturabilmektedir. M koloni varyantları genellikle kistik fibrozisli hastaların balgam örneklerinde tanımlanmaktadır. Oksidaz pozitif olması, üç şekerli demirli besiyerinde

fermentatif etki göstermemesi, 42°C'de üreyebilmesi ve MHA'da pigmentinin gözlenmesi tanı koydurucu özelliklerdir (26). Pigment oluşturmayan *P. aeruginosa* suşları da bulunabilmektedir. Bu suşların tanımlanması amacıyla glukoz oksidasyonu, asetamit hidrolizi ve nitratların nitrojen gazına redüksiyonu testleri yapılmaktadır. Rutin laboratuvarlarda uygulanan konvansiyonel, biyokimyasal testlerin yanında tanımlamada kullanılabilen ticari otomatize sistemler de bulunmaktadır. Bu sistemler tanımlamayı ortalama %90-100 doğru yapmakta ve sonuçlar 4-48 saatte alınabilmektedir (44).

2.1.4. Epidemiyoloji

P. aeruginosa doğada yaygındır. Nemli ve güneş ışığından yoksun yerlerde, yiyeceklerde, yüzeysel sularda uzun süre canlı kalmaktadır (9). *P. aeruginosa* vejetatif bakteriler içinde, çevre koşullarına kendini en iyi adapte edebilenlerdir. Yeterli nem sağlandığında, çok az besin maddesiyle, uzun süre canlı kalabilir. Hastane ortamında solunum cihazları, duşlar, banyolar, fosekler, soğuk su nemlendiricileri, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler, tamponlar, yerler gibi çok sayıda alandan izole edilebilirler (26,41).

P. aeruginosa insanların normal florasında da bulunabilir. Hastane dışındaki veya hastaneye başvuran sağlıklı kişilerde düşük oranda bulunur. Deride %0-2, burun mukozasında %0,3-3, boğazda %0,6-6, dışkıda %2,6-24 arasındadır. Hastaneye yatan özellikle yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sistemlerinde ve geniş spektrumlu antibiyotik alan hastaların herhangi bir bölgesinde taşıyıcılık oranı oldukça artabilir. Her bir örnekte kolonizasyon oranı %50'ye kadar çıkabilir (26).

2.1.5. Patogenez

Sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa yol açan fırsatçı bir patojendir. İmmunitesi sağlam kişilerde virulans faktörlerinin büyük bir kısmına sahip olmasına rağmen hastalık oluşturmamasının nedeninin infeksiyon oluşumu için gerekli olan ilk aşamaları geçmedeki yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (93,84). Hastalık normal konak savunmasının değişmesiyle başlar. Deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması, immun sistemde yetmezlik gelişmesi, normal bakteriyel floranın ortadan kaldırılması gibi durumlar infeksiyona zemin hazırlar. İnfeksiyonlar bakteriyel

bağlanma ve kolonizasyon, lokal invazyon, yayılma ve sistemik hastalık şeklinde üç aşamada gerçekleşir. Virülans faktörleri üç aşamanın oluşumunu da düzenler ve klinik tablonun oluşumuna katkıda bulunur (93,26).

2.1.6. Virülans Faktörleri

P. aeruginosa pek çok virülans faktörüne sahiptir. Virülans faktörlerinin rolü ve önemi, bağışık yanıt ve infeksiyonun oluştuğu vücut bölgesi gibi bazı konak faktörlerinden etkilenir. Virülans faktörleri ile konak faktörleri arasındaki denge infeksiyonun seyrini belirleyen kriterdir (80).

2.1.6.1. Konak Faktörleri

P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmelidir. İnfeksiyonun gelişiminde konağın immün durumu büyük önem taşımaktadır. Bütünlüğü sağlam deride infeksiyon meydana gelmezken, yara veya yanık bölgesi gibi bütünlüğü bozulmuş bölgelere yerleşen bakteri çoğalarak kana geçebilir. Mukozal bariyer fonksiyonlarının kaybı *P. aeruginosa*'yı önemli bir patojen haline getirmektedir. Normal bakteriyel floranın varlığının da infeksiyonlara karşı koruyucu görevi vardır. Doğal bağışıklık sisteminin bu önemli elemanları kanser kemoterapisi, antibiyotik kullanımı, üst solunum yolunda endotrakeal tüp kullanımı gibi nedenler ile hasara uğrayabilir ve doğal bağışıklık sistemi görevini yerine getiremez (80). Mukozal yüzeylerde ve kanda bulunan kompleman ve kollektinler gibi çözünür faktörler opsonizasyonu sağlayarak fagositozun etkisini artırmaktadır. Bu faktörlerde ortaya çıkabilecek bozukluklar konağın savunma mekanizmalarını zayıflatır. Konak savunma mekanizmasında önemli etmenlerden olan IL-1, TNF-alfa, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-18, TGF-beta ve nitrik oksit gibi sitokin, kemokin ve oksijen radikalleri, bir taraftan infeksiyonu baskılamaya çalışırken diğer taraftan enflamasyona yol açar ve doku hasarına neden olabilirler. Bağışıklık sisteminde önemli yeri olan bu mediyatörlerin daha az ortaya çıkmasına veya etkilerinin kısıtlanmasına neden olan faktörler, infeksiyonun gelişimini kolaylaştırabilir ve kontrol altına alınmasını güçleştirebilir (80,93).

2.1.6.2. Bakteriyel Faktörler

Yüzey adezinleri: *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde pili ve nonpili hücre yüzey komponentleri olmak üzere iki tip protein adezini tanımlanmıştır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir. *P. aeruginosa* pilileri epitelyal yüzeylere bağlanırken musine bağlanma nonpilus adezinlerle sağlanır (93). Pilusların saflaştırılması da, bu yapılara karşı gelişen antikorlar da epitele tutunmayı engeller pilusları ile öncelikle sialik asitsiz gangliosid reseptörlere (asialo GM1) tutunur. Bu bakteriler aynı zamanda nöraminidaz üretir ve oluşan nöraminidaz, gangliosidlerdeki salik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşturulmuş olur (26). Piliye bağlı tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önem kazanırken, aljinata bağlı tutunma, mukosiliyer aktivitenin hasar gördüğü durumlarda, alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk basamağı oluşturmaktadır (7).

Aljinat (Mukoid ekzopolisakkarit): *P. aeruginosa*, mukoid ekzopolisakkarid veya glikokaliks olarak da bilinen birçok fonksiyona sahip polisakkarid bir kapsül oluşturur. Bu yapı aljinatla sonlanan tekrar eden yapılar şeklinde mannuronik asit ve glukoronik asitten oluşmaktadır. Bu karbonhidrat bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir, onu iyice tesbit eder ve konak savunmasından bakteriyi korur. Ayrıca aljinat *P. aeruginosa*'ya karşı kullanılan aminoglikozitlerin bakterisit etkisini inhibe edebilir (26,84).

Pigmentleri: *P. aeruginosa* kökenlerinin büyük çoğunluğu bir ya da daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, turkuaz mavisi renkli piyosiyenin pigmentidir. Bu özellik *P. aeruginosa*'nın tamsı için önemlidir. Her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamışsa da, diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları saptanmıştır. Ayrıca piyosiyenin pigmenti bakteri hücrelerinin demir alımında da rol oynamaktadırlar (7,66).

Hemolizinler: *P. aeruginosa* iki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir. Bu iki madde sinerjik hareket ederek lipidleri ve lesitini hasara uğratar. Proteazlar gibi hemolizinler de nekroz yaparak, infeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardım eder (26).

Ekzotoksin A: Hücre dışı bir enzim olup *P. aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından yapılır. Difteri toksinine benzer bir mekanizma ile protein sentezini önler. Her iki toksin de adenozin difosfatın transferini katalize eder. Bu reaksiyon Elongasyon Faktör 2 (EF2)'i inaktive ederek protein sentezini inhibe eder (93). Ekzotoksin A'nın lokal doku hasarında ve bakteriyel invazyonda rolü vardır. Saflaştırılmış ekzotoksin A, küçük dozlarda bile hayvanlar için letaldir (80). Ekzotoksin A'nın monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırması bu hastalarda oluşan kronik akciğer infeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır (7).

Ekzoenzim S: Ekzotoksin A gibi bu protein de bir adenozendifosfat ribozil transferazdır. Hedef proteini henüz tanımlanmamıştır. Saf ekzoenzim S, fareler için toksiktir. Doku kültürlerindeki hücelere sitopatik etki gösterir. Ekzoenzim S salgılayamayan mutant suşlar, deneysel yanık ve kronik akciğer infeksiyonlarında daha az virülandır (26). Ekzoenzim S oluşturan suşlarla oluşan infeksiyonlarda mortalitenin daha yüksek olması bu enzimin *P. aeruginosa*'nın etken olduğu progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını göstermektedir (7,110).

Proteazlar: Alkali proteaz ve elastaz, *P. aeruginosa* infeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan jelatini, kazeini, laminini ve immünoglobulinleri parçalayan proteazlardır. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır. Las-A (serin proteaz) ve Las-B (çinko metalloproteaz) elastazlar, sinerjistik etkiyle elastanın yıkımına neden olurlar ayrıca deri, akciğer ve korneada nekrotizan etkiye sahiptirler (69). Elastazlar kan damarlarındaki internal elastik laminayı yıkarak hemorajilere neden olurlar, aynı zamanda *Pseudomonas* sepsisinde görülen ektima gangrenozumdan da sorumludurlar (103). Alkalın proteaz, elastazlara benzer şekilde doku yıkımına ve bakterinin yayılmasına neden olur (69).

Endotoksin: *P. aeruginosa*'da bulunan lipopolisakkarit endotoksin önemli bir hücre duvarı antijenidir. Endotoksinin lipit A komponenti, sepsis sendromundaki çeşitli biyolojik etkilerden sorumludur (69).

2.1.7. Oluşturduğu İnfeksiyonlar

P. aeruginosa, yüzeysel bir deri infeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli infeksiyonlara neden olabilir (44). Hastane infeksiyonu etkenleri içinde ilk

sıralarda yer almakta, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte ve oluşturduğu infeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (84).

Endokardit: *P. aeruginosa* protez kalp kapağı bulunan hastalarda protez kalp kapağına, ilaç bağımlılarında doğal kalp kapağına yerleşerek enfektif endokardite neden olabilmektedir (7). Triküspid kapak daha sık olmakla birlikte pulmoner, aortik veya mitral kapak tutulabilir (84).

Merkezi sinir sistemi infeksiyonları: *P. aeruginosa* menenjit ve beyin abselerine yol açar. *P. aeruginosa* kanser hastalarında *Listeria monocytogenes*' den sonra ikinci sıklıkta menenjit etkeni, *Escherichia coli*' den sonra ikinci sıklıkta beyin apsesi etkeni olarak bulunmuştur (7).

Deri ve yumuşak doku infeksiyonları: *P. aeruginosa*'nın etken olduğu bakteriyemi sırasında tipik olarak ektima gangrenosum denilen deri lezyonları gelişebilir. Ayrıca derialtı nodülleri, derin apseler, selülit, veziküler veya püstüler lezyonlar, bülleler görülebilir (84).

Üriner infeksiyonlar: Genellikle hastanede kazanılır. Üriner kateterizasyon, cerrahi ve böbrek transplantasyonu ile ilişkilidir. Hastanede kazanılmış üriner sistem infeksiyonlarının %11,7'sinden sorumlu olan *P. aeruginosa*, *E. coli* ve enterokoklardan sonra üçüncü sıklıkla izole edilen etkindir (26).

Kemik ve eklem infeksiyonları: Hematojen infeksiyonlar genellikle intravenöz ilaç bağımlılarında; üriner sistem veya pelvik infeksiyonu sonrasında gelişir. Komşuluk yolu ile infeksiyon ise penetran travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku infeksiyonu sonrasında oluşur (7).

Göz infeksiyonları: Penetran travma sonrası göze yabancı cisim veya kontamine damlaların damlatılması ile konjunktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit gibi göz infeksiyonları şeklinde gelişebilen ve bazen görme kaybı ile endoftalmitte neden olabilen infeksiyonlardır (7).

Kulak infeksiyonları: *P. aeruginosa* çok nadir olarak sağlıklı görünen bireylerin kulağında bulunabilir. Ancak zedelenme, enflamasyon veya basit olarak nemlilik yaratan ortamlarda dış kulak yoluna yerleşir. Ayrıca orta kulak infeksiyonu veya dış kulak yolu infeksiyonlarından sonra mastoidit gelişebilir. Bu hastaların çoğunda diabetes mellitus veya bağışıklık sistemini baskılayan başka bir hastalık bulunmaktadır (80).

Solunum sistemi infeksiyonları: *P. aeruginosa*'nın etken olduğu alt solunum yolu infeksiyonları genelde konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında hasar olduğunda görülür. *Pseudomonas* kaynaklı kronik akciğer infeksiyonları, anormal solunum yolları sekresyonunun olduğu genetik bir hastalık olan kistik fibrozisli hastalarda daha sık ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda etkili olamayan opsonizasyon, fagositoz ve bakterisit mekanizmalar *P. aeruginosa* infeksiyonlarının gelişmesine katkıda bulunur (26).

Gastrointestinal sistem infeksiyonları: *P. aeruginosa* orofarinksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde kolonizasyon yapabilir. İnfeksiyon en sık yenidoğanlarda, hematolojik malinitesi olanlarda ve kemoterapi gören nötropenik hastalarda ortaya çıkar. *Pseudomonas* sepsisi için gastrointestinal sistem önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (7,103).

2.1.8. *P. aeruginosa* İnfeksiyonlarının Tedavisi

P. aeruginosa infeksiyonlarının tedavisi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere çoklu direnç göstermeleri nedeni ile zordur (26). Tedavi sırasında yaklaşık %10 oranında direnç gelişim riski vardır. Bu yüzden *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu önemli infeksiyonlarda kombine ilaç tedavisi uygulanmalıdır (114). *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisilinler; seftazidim, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem ve meropenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktamlar; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin, minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır (7,9,103). Dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu infeksiyonların sağaltımında çoğunlukla geniş spektrumlu antipseudomonal özellikte beta-laktam ajanlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar tek başlarına veya kombine edilerek kullanılmaktadır. Beta-laktam ajanlar uygulanan tedavi rejimlerinin vazgeçilmez elemanlarıdır. Bu yaygın kullanımlarına paralel olarak direnç gelişimi de siktir (25).

2.1.9. *P. aeruginosa*'nın Antibiyotiklere Direnci

P. aeruginosa'da pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik direnç bulunmaktadır. Ampisilin, amoksilin, amoksilin/kavulonat, 1. kuşak sefalosporinler, 2. Kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit, trimetoprim *P. aeruginosa*'nın doğal dirençli olduğu antibiyotiklerdir (60). Bu intrinsik ilaç direncinde yapısal olarak bulunan ilaç atım pompaları ile dış membran geçirgenliğinin düşük olması birlikte rol oynar (94). Minimal seviyede sentez edilmesine rağmen Amp C tipi beta-laktamazlar; penisilin G'ye, aminopenisilinlere, birinci kuşak sefalosporinlere ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlarda doğal dirence neden olur (23).

2.1.9.1. Kazanılmış Direnç

Çeşitli antibiyotikler doğal direncin üstesinden gelir ancak tüm antipseudomonal antibiyotiklere karşı mutasyonel direnç gelişebilir (44). Direnç mekanizmaları şu şekilde sınıflanabilir:

- Beta-laktamaz salınmasına bağlı direnç; kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi.
- Antibiyotik hedeflerinde değişiklik sonucu oluşan direnç; penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)'deki değişime bağlı olan bu direnç gram negatif bakterilerde yaygın değildir. Bununla birlikte pseudomonas cinsi bakterilerde beta-laktamaz üretmeyen suşlardaki penisilin direncine düşük afiniteli PBP'ler neden olur.
- Dış membran geçirgenliğinin azalması ile kazanılan direnç; porin proteinlerinde değişiklik.
- Aktif dışa pompalama sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasına bağlı direnç (34,40,62).

2.1.9.2. Aktif Dışa Pompalama Sistemleri

İlaç atım pompaları *P. aeruginosa*'daki çoklu ilaç direncinin son derece önemli nedenlerindedir (88). Aktif dışa pompalama sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa

pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasını ve antimikrobiyallerin de dışarı atılmasına neden olur (71,104). *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM aktif dışa pompalama sistemleri tanımlanmış olup MexAB-OprM aktif dışa pompalama sistemi en iyi tanımlananıdır (62).

Aktif pompalama sistemi ile kazanılan direnç çoklu direnç genine sahip fenotipler oluşturur. MexAB-OprM aktif pompalama sistemi imipenem hariç tüm beta laktamlara ve kinolonlara direnç oluşturması ile önemlidir. MexCD-OprJ aktif pompalama sistemi 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN aktif pompalama sistemi karbapenemlerde de dirence neden olabilir.

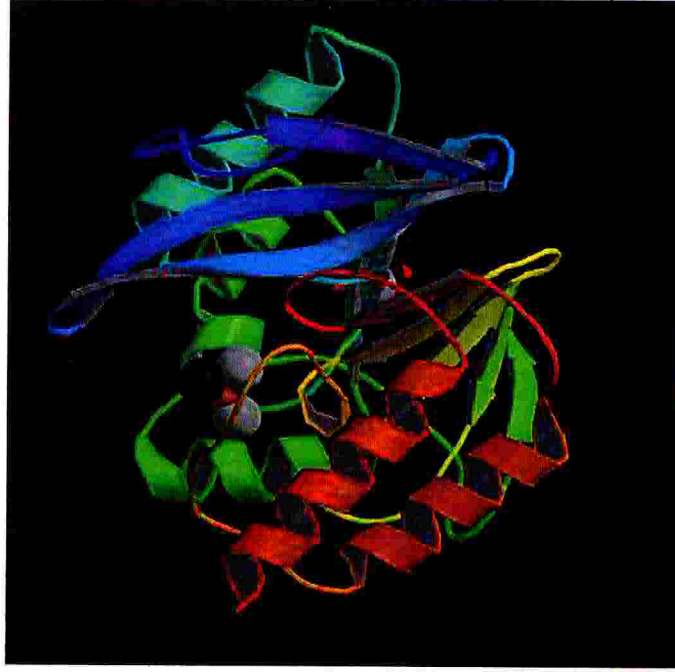
P. aeruginosa' da çoklu antibiyotik direnci en az üç mutasyon sonucu ortaya çıkan nalB, nfxB, nfxC gen mutasyonlarıdır. Bunların hepsi düzenleyici genlerdeki değişikliklere ek olarak aktif dışa pompalama sistemlerinde aşırı salınmaya neden olurlar (42,71).

2.1.9.3. Dış Membran Porin Defektleri

Dış membran gram negatif bakteriler için oldukça önemlidir. *P. aeruginosa* dış membranındaki asıl porin proteini OprF'dir. OprB, OprC, OprD, OprE yardımcı porin proteinleridir (71). OprD porin kaybı imipenem direncine, meropenem duyarlılığında azalmaya yol açar. *P. aeruginosa*'nın karbapenem tedavisinde ilk haftanın sonunda OprD kaybı ile yaklaşık olarak %25 oranında direnç geliştiği gösterilmiştir (88).

2.1.9.4. Beta- laktamazlar

Beta-laktamaz enzimleri ile inaktivasyon beta laktam antibiyotiklere karşı dirençte en sık gözlenen mekanizmadır (37,61). Beta-laktamazlar; beta laktam antibiyotik yapısındaki beta laktam halkasının amid bağlarını parçalayan ve bu antibiyotikleri etkisiz kılan, kromozom, plazmid veya transpozonlar tarafından ifade edilebilen, yapısal olarak veya indüksiyon sonucunda sentezlenen enzimlerdir. Gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram negatif bakterilerde periplazmik boşluğa, gram pozitif bakterilerde ise çevresini saran ortama salgılanır (62,92).



Şekil 2.1. Beta laktamaz enzimlerinin yapısı (46)

Beta-laktamazlar, heterojen bir grup protein olmalarının yanı sıra, bazı yapısal benzerlikler de taşırlar (61). Beta-laktamazların sınıflandırmasında Ambler ve Bush-Medeiros-Jacoby sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır. Ambler sınıflandırması; beta-laktamazları aminoasit dizilerinin benzerliğine göre dört gruba ayırmaktadır. Grup A, C ve D serin beta laktamazlardır, Grup B enzimleri ise metallo beta-laktamazlardır. Bush-Medeiros-Jacoby sınıflandırması beta-laktamazları işlevlerindeki benzerliklere göre (substrat ve inhibitör profilleri) gruplandırmaktadır. Bush-Medeiros-Jacoby sisteminde dört kategori ve çok sayıda alt grup bulunmaktadır. Tablo 2.1.'de bu iki sınıflandırma sistemi görülmektedir (86).

Tablo 2.1. Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar (86)

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

A-Sınıfı Beta-Laktamazlar

Aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunan, birçoğu klavulanik asit ile inhibe olan, genelde plazmit gibi hareketli genetik elemanlarca kodlanan enzimlerdir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde en sık rastlanan A sınıfı beta-laktamazlar, TEM-1 ile SHV-1'dir. Bu enzimler temel olarak penisilinazdırlar ve sefalosporinlere karşı etkinlikleri çok azdır. Bu enzimler, günümüzde birçok hastanede yaygın olarak rastlanan GSBL'lerin atalarıdır. GSBL'lar birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanısıra, oksimino sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz edebilen,

klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlardır. Sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin, sefotetan, sefmetazol) karşı etkisizdirler (TEM-52 hariç) (86). GSBL'ler birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanısıra oksiiimino sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz eden, klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlardır.

TEM ve SHV türevi olmayan birçok A sınıfı beta-laktamaz da bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER grubu (*PER-1* ve *PER-2*) enzimlerdir. CTX-M substrat olarak sefotaksimi tercih eden, tazobaktamın inhibitör özelliği diğer beta-laktamaz inhibitörlerine göre daha fazla olan plazmit aracılı GSBL'lerdir (38,86).

B Sınıfı Beta-Laktamazlar

Aktif bölgelerinde “serin” bulunan sınıf A, C ve D'den farklı olarak B sınıfı beta-laktamazlar metallo enzimlerdir ve aktiviteleri için çinko veya diğer ağır metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta-laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok sefalosporine direnç geliştirirler. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmezler (74). Günümüze kadar bildirilmiş olan beş ayrı MBL türü bulunmaktadır. Bunlar IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (Sao Paulo Imipenemase), GIM-1 (German Imipenemase) ve SIM-1 (Seul Imipenemase) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IMP ve VIM dünya çapında en sık rastlanan beta-laktamazlardır (57).

C Sınıfı Beta-Laktamazlar

C sınıfı beta-laktamazlar, kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* spp. haricinde tüm gram-negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır (34). C sınıfı beta-laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri, penisilinlere oranla daha iyi hidroliz ederler ancak birçok C sınıfı enzim, beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens* gibi türlerde kromozomal olarak kodlanan bu enzimler önem taşır. AmpC tipi beta-laktamaz genlerinin konjugatif plazmitler üzerinde de bulunabildiği gösterilmiştir. Plazmit

kaynaklı C sınıfı enzimler daha çok *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Salmonella spp*, *Proteus mirabilis*, *M. morgani* ve *K. oxytoca* gibi suşlarda saptanmıştır. Plazmit kaynaklı AmpC enzimi üreten suşlarda, porin proteinlerinin kaybı sonucu karbapenemlere de direnç geliştirebilmektedir (86).

D Sınıfı Beta-laktamazlar

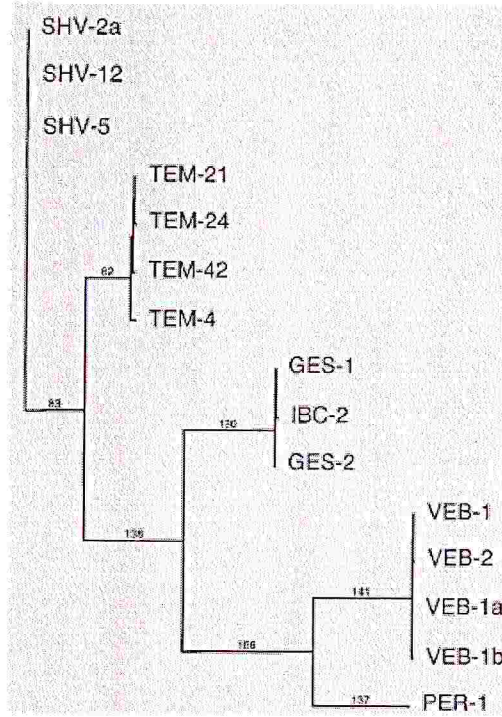
D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup, oksasilini hızla hidroliz edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidroliz edebilen (OXA) beta-laktamazlar, daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P. aeruginosa*'da saptanmıştır. OXA enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnci sağlar. Klavulanik asit ile çok az inhibe olmalarına rağmen, NaCl iyi bir inhibitördür. Plazmit veya integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaları, bakteriler arasında yayılmalarına katkıda bulunur (86). Bazı OXA tipi enzimler (OXA-10-11, OXA-13-14-17-18-19, OXA-28) GSBL karakterindedir (10). OXA-23 *Acinetobacter baumannii*'de tanımlanan karbapenemaz niteliğinde bir enzimdir (86).

2.2. PER-1 Enzimi

PER (Pseudomonas extended resistant) enzimi; görülme sıklığı giderek artan, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ailesinin önemli bir üyesidir ve iki tip PER enzimi bildirilmiştir. PER-1 enzimi ilk kez 1991 yılında Paris'te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış, 1993 yılında ise Nordmann ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. PER-2 enzimi ise %86 oranında PER-1'e aminoasit benzerliği gösteren, Arjantin'de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* ve *E. coli* suşlarında saptanan bir enzimdir (24,81).

PER-1 enzimi; izoelektrik noktası (pI) 5.4 ve moleküler büyüklüğü yaklaşık 29 kD olan, TEM veya SHV türevi olmayan sınıf A'da yer alan bir GSBL'dir (63,73). *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* başta olmak üzere *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes faecalis* gibi farklı gram-negatif bakterilerde bulunabilir (102,103). Seftazidim, seftibuten, sefotaksim, sefepim gibi oksimino-beta laktamlara ve aztreonama karşı direnç geliştirir. Ancak birçok GSBL gibi karbapenem ve sefamisinlere karşı etkisizdir ve klavulanik asit ile inhibe olur (72). İmipenem ve

meropenem ise PER-1'den etkilenmez. 1994'te yapılan sekans analizi sonuçları *PER-1* enziminin 308 aminoasitlik bir polipeptidi kodlayan 924 bp büyüklüğünde open reading frame (ORF) bölgesi taşıdığını, TEM-SHV grubu GSBL'ler ile %27, D sınıfı beta-laktamazlar ile %17, C sınıfı beta-laktamazlar ile %20 oranında amino asit benzerliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Bazı A sınıfı beta-laktamazlar ile *PER-1*'in evrimsel yakınlığı şekil 2.2'de gösterilmektedir. Aynı analiz sonuçlarına göre *PER-1* geni *P. aeruginosa* kaynaklı değildir (73).



Şekil 2.2. A sınıfı beta-laktamazlar ile *PER-1*'in evrimsel yakınlığı (108)

Birçok suşta *PER-1* enzimini kodlayan genlerin kromozomlar üzerinde lokalize olduğu veya integron, plazmit ve transpozon gibi hareketli genetik elemanlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18,77,81,102). *PER-1* ilk olarak Fransa'da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda bulunmuş, daha sonra *S. typhimurium* suşlarında tanımlanmıştır (72,112). *PER-1* enzimi Türkiye'de *Acinetobacter* spp. ve *P. aeruginosa* suşlarında sık olarak identifiye edilmektedir. Türkiye ve Fransa dışında Kore ve Belçika'da da *PER-1*'e rastlanmıştır (72,102).

PER-1 üreten bir *P. aeruginosa* suşunda aynı zamanda karbapenemlere direnç gelişiminden sorumlu VIM-2 metallo beta-laktamazının ve yine PER-1 sentezleyen bir *Proteus mirabilis* suşunda GSBL özelliğindeki TEM-52'nin saptanması, *Alcaligenes faecalis* ve *Providencia rettgeri* gibi farklı gram-negatif bakterilerde de görülmesi, PER-1 sentezleyen suşlarla gelişen infeksiyonların önemini artırmaktadır (6,20,76).

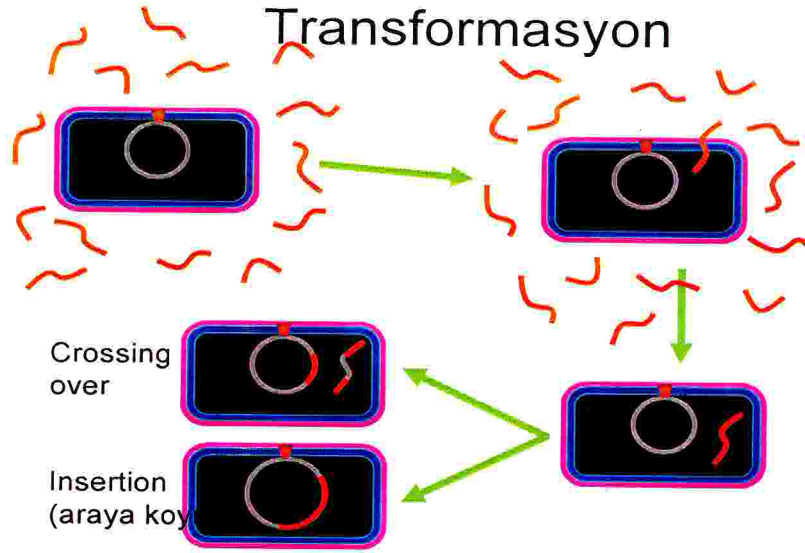
Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, PER-1'in tanımlanması amacıyla fenotipik yöntem olarak; izoelektrik odaklama (İEO), antibiyogram paterni/çift disk sinerji testi, genotipik yöntem olarak; koloni hibridizasyon, PZR, dizi analizi gibi testler birarada kullanılmıştır (72,73,102). PER-1 enzimi daha çok *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi çoklu dirençli hastane infeksiyonu etkeni suşlar tarafından sentezlenir. Dirençli suşlarda aynı zamanda AmpC tipi enzimlerin aşırı üretimi, metallo beta-laktamazlar ve OXA türevleri gibi farklı grup enzimlerin eş zamanlı ekspresyonu, dış membran geçirgenliğinde azalma ve aktif pompa sistemleri gibi direnç mekanizmaları da devreye girmesi gibi nedenlerle PER-1 enzimi varlığının çift disk sinerji gibi fenotipik yöntemler ile taranması oldukça güçtür. Fenotipik bir test olan İEO; TEM-1 gibi beta-laktamazların izoelektrik noktalarının PER-1'e çok yakın oluşu ve çeşitli faktörlerin etkilerine duyarlı bir yöntem olması nedeniyle tanımlamada tek başına kullanılamamaktadır. PER-1 enzimini kodlayan gen varlığının belirlenmesinde PZR ve dizi analizi yöntemleri daha güvenilir olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (108). PER-1 üreten suşların geniş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamların yanı sıra, aminoglikozitler, florokinolonlar ve karbapenemlere de direnç geliştirebilmeleri tedavide önemli sorunlara yol açmaktadır (67). PER-1 sentezleyen suşların tedavisinde imipenem önemli bir yere sahip olmakla birlikte, yoğun kullanım sonucu, metallo betalaktamaz üreten bakterilerin hastane ortamında çoğalmasına gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (63).

2.3. Beta-Laktamaz Genlerinin Yayılma Yolları

Dirence yol açan genlerin duyarlı patojenlere aktarılması transformasyon, transpozisyon ve konjugasyon olmak üzere başlıca 3 mekanizma ile gerçekleşir (86).

2.3.1. Transformasyon

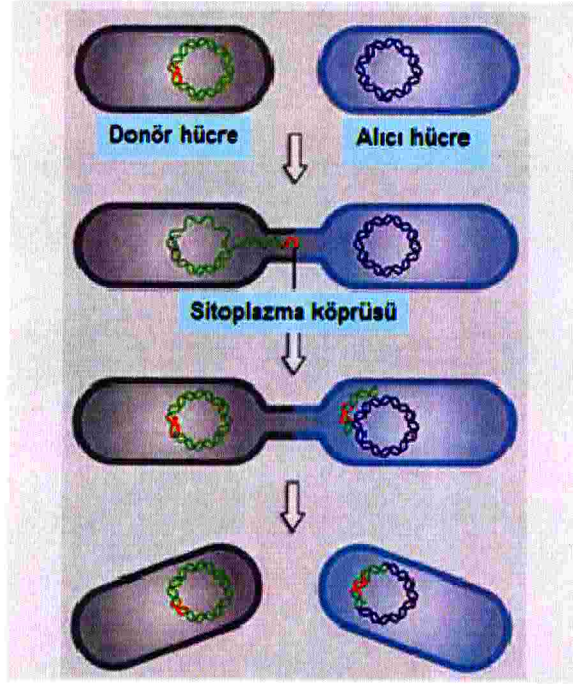
Uygun koşullarda ortamda bulunan çıplak DNA moleküllerini alma yeteneğidir. Yabancı DNA parçaları duyarlı bakteri kromozomuna rekombinasyon ile girmektedir. Kazanılan gen duyarlı doğal proteinden daha az duyarlı bir proteini kodluyorsa duyarlılıkta azalma oluşabilir. Bu yolla kazanılan mozaik penisilin bağlayan protein genleri *Streptococcus pneumoniae* 'da penisilin ve sefalosporin direncine yol açar (86).



Şekil 2.3. Transformasyon ile gen aktarımı (48)

2.3.2. Konjugasyon

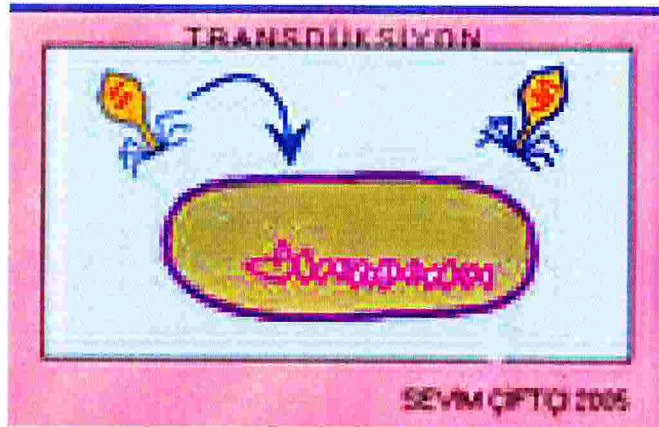
Konjugasyon iki bakteri hücrelerinin teması sonucunda genetik eleman aktarımıdır ve türler arası plazmid aktarımının *in vivo* koşullarda da oluşabilmesi önem taşımaktadır. Özellikle geniş bir konakçı spektrumuna sahip, F faktörü gibi plazmitlerin, çeşitli türler arasında geçişi buna örnek verilebilir (86).



Şekil 2.3. Konjugasyon ile gen aktarımı (45)

2.3.3. Transdüksiyon

Direnç genlerinin bakteriyofajlar aracılığıyla aktarılması olayıdır. Fajın, bakteri hücresi içinde oluşumu esnasında, kapsit proteinlerinin içine, kendi genomlarının bitişiğindeki bazı kromozomal parçaları (özgül transdüksiyon) veya kendi genomları ile yaklaşık aynı büyüklükteki (genellikle 40 kb civarı) ilgisiz bir plazmit ya da kromozom parçasını paketlemeleri (jeneralize transdüksiyon) olayıdır (86).



Şekil 2.5. Transdüksiyon ile gen aktarımı (47)

Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomuna veya plazmit, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanların üzerine yerleşerek transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyon mekanizmalarını kullanarak bir mikroorganizmadan diğerine geçebilirler (86,25).

2.3.4. Plazmitler

Plazmitler 4-400 kb büyüklüğünde, sirküler, çift sarmallı DNA içeren ekstrakromozomal genetik yapılardır. Kendi kendilerine çoğalma yeteneğine sahiptirler. Plazmitler bakterilere antibiyotik direnci yanında bakterinin virulansı ve metabolik özelliklerini etkileyebilecek fonksiyonlar kazandırabilirler (98). Plazmitler, kendilerini diğer mikroorganizmalara aktarabilme yeteneklerine göre de sınıflandırılabilirler. Bir bakteri hücresinden diğerine kendini aktarabilenlere “konjugatif plazmitler” adı verilir. Non-konjugatif plazmitler genelde konjugatif olanlara oranla daha küçüktür. Bazı non-konjugatif plazmitler, aynı hücrede bulunan konjugatif bir plazmitin yardımı ile “mobilize” olarak diğer hücreye aktarılabilirler. Plazmitlerdeki direnç genleri transpozon ve integron gibi mobil genetik elementlere yerleşerek başka direnç genleri ile bağlantılı plazmit veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde birbiri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç gelişebilir (89).

2.3.5. Transpozonlar

Transpozonlar 2-20 kb büyüklüğünde, kendi kendine replike olamayan ancak plazmit veya kromozomla birlikte replike olabilen, bağımsız olarak hareket edebilen genetik yapılardır (31). Transpozonlar, plazmitten plazmite, plazmitten bakteriyofaja, plazmitten kromozoma veya tam tersi yönde geçiş yapabilir. Beta-laktamaz genleri de dahil olmak üzere, birçok antimikrobiyal direnç geninin transpozonlarla ilişkisi gösterilmiştir (86).

2.3.6. İntegronlar

Hall ve Collins tarafından tanımlanan integronlar bölgeye spesifik rekombinasyon sistemine sahip hareketli gen kasetleri içeren genetik determinantlardır (28). Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ile transpozon ve konjugatif plazmitler gibi

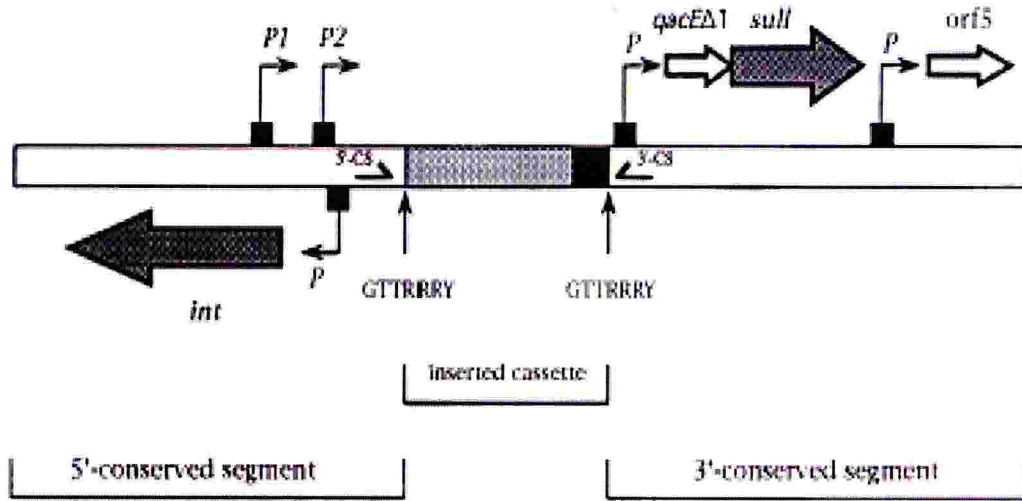
hareketli doğal elemanlar bulunmuştur. Bu elemanların karşılıklı dizi analizleri yapılarak integronların varlığı gösterilmiştir (90).

İntegron, gen kasetleri olarak adlandırılan hareketli elementlerin içerdiği genleri yakalama ve hareketlendirme yeteneğine sahip bir bölgeye-spesifik rekombinasyon sisteminin bileşenlerini içeren genetik bir birimdir. İntegronlar ayrıca gen kasetlerinin ekspresyonu için bir promotor olarak iş görürler ve bu nedenle doğal klonlama sistemi ve ekspresyon vektörleri olarak davranırlar (39).

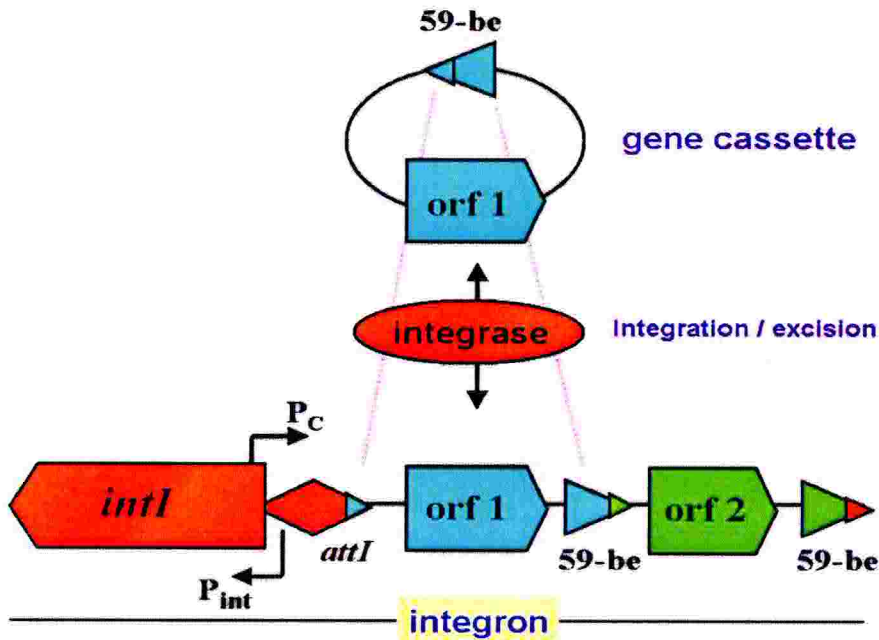
İntegronlar; iki korunmuş bölge (5'-3' korunmuş bölge) ve bunların arasında yer alan, çoğunlukla da antibiyotik direnç genlerini içeren gen kasetlerinden oluşur (16). (Şekil. 2.6). Gen kasetleri direnç genlerini plasmid ve transpozonlar aracılığıyla taşınmaları için onlara da aktarabilirler (32). Bu nedenle integronlardaki gen kasetlerine ait antibiyotik direnç genlerinin klinik örneklerden izole edilen gram negatif bakteriler arasında yayılması beklenen bir etkidir (4).

İntegronlarda 5' korunmuş bölgede; integras ailesine ait bir bölgeye-spesifik rekombinazı kodlayan *int* geni, hemen yakınında kasetler için reseptör vazifesi gören ve integras tarafından tanınan *attI* bölgesi ve kaset kodlayan genlerin ekspresyonuna uygun olarak tasarlanmış bir promotor Pc bölge bulunur. Kasetler, bir veya daha fazla sayıda gen (çoğunlukla antibiyotik direnç geni) ve 59- baz elementleri olarak bilinen bir ailenin üyesi olan integras-spesifik rekombinasyon bölgesi içerir. Bir integron içinde çok farklı sayıda gen kaseti yer alabilmekte ve bu da çoklu ilaç direncine neden olmaktadır. Genellikle bir bakteri içerisinde birden fazla sayıda integron bulunmaktadır. Kasetler serbest halde iken sirküler formda bulunabildikleri gibi bir integrona *attI* bölgesinde entegre durumda iken doğrusal halde bulunmaktadırlar. İntegronla ilişkili *attI* bölgesi ve spesifik rekombinasyon olayı serbest sirküler kasetin alıcı bir integrona eklenmesine yol açmaktadır. Eklenen her genin kendine özgü 59 baz-çift bölgesi bulunmaktadır (15,87).

İntegras ayrıca, integrondan kasetlerin kaybına ve serbest sirküler kasetlerin oluşmasına yol açabilecek delesyon rekombinasyonlarını da katalizleyebilir. Yeni genleri kazanabilme yeteneklerinden ötürü, integron içeren plazmit ve transpozon genomlarının evrimleşmesinde integronlar açık bir role sahiptir. Bununla beraber, ayrıca evrimde daha genel bir role sahip olması olasıdır (39). 3' korunmuş bölgede fonksiyonu hakkında net bir bilgi olmayan tek bir ORF, dezenfektanlara dirençten sorumlu *qacE-I* ve sulfonamidlere direnç sağlayan *sulI* geni bulunmaktadır (83).



Şekil 2.6. İntegronların genel yapısı (25)



Şekil 2.7. İntegronlara gen kasetlerinin eklenmesi (49)

İntegronlar, direnç integronları (RI) ve süper integronlar (SI) olmak üzere 2 major gruba ayrılır. Kromozom veya plazmidler üzerine yerleşen direnç integronlarının taşıdıkları gen kasetleri genellikle antibiyotik ve dezenfaktanlara direnç oluşturur. Süper integronlar ise değişik fonksiyonlar gösteren gen kasetlerini taşıyan kromozomal yerleşimli büyük integronlardır (28). Günümüzde integras (intI) genlerindeki farklılıklara göre belirlenen 10 sınıf integron olduğu bilinmektedir. Bunlardan 5 tanesi antibiyotik direnci ile

ilişkilidir. Bunlar arasında gram negatif bakterilerde en sık görülen ve en iyi tanımlanan sınıf-1 integrondur (96).

Sınıf-1 integronların raporlandığı birçok gram negatif bakteri arasında *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio* yer alır. *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium fortuitum* ve *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* gibi gram pozitif bakterilerde de bildirilmiştir.

Sınıf-2 integronlar Tn7 transpozon familyasında yer alır. *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Shigella* türlerinde bulunmuştur.

Sınıf-3 integronlar Japonya'dan bildirilmiş olup; *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* 'da gösterilmiştir (28,96).

İntegronlar tarafından 60'dan fazla direnç geninin kodlandığı bildirilmiş olup, bunlar aminoglikozitler, beta-laktam ajanlar, kloramfenikol, makrolidler, sulfonamidler, antiseptik ve dezenfektanlar gibi çeşitli ajanlara direnç gelişiminden sorumludurlar (64, 109). İntegronlar doğal klonlama sistemleri ve ekspresyon vektörleri olarak iş gördüklerinden, birçok direnç determinanti taşıyabildiğinden ve kolaylıkla hareket edebildiğinden antibiyotik direnci üzerindeki etkileri çok önemlidir (16). Çeşitli gram negatif suşlarda çoklu antibiyotik direncinin hızla gelişimi, antibiyotik direnç determinantlarının integronlar tarafından alınıp yayılmasının sonucudur. İntegronlar bla genlerinin yayılımının önemli bir kaynağıdır. Ambler'in A, B ve D gruplarına ait beta-laktamazları taşıyan integronlar *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve diğer gram (-) bakteri türlerinde bulunmuştur. VEB-1, VEB-2, GES-1, GES-2, CTX-M-2, CTX-M-9, PSE-1 ve çeşitli OXA beta-laktamazlar integronlarca taşınan beta-laktamazlardır (86,107).

İntegronların hastane ortamındaki kaynaklarının neler olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte hastaneye yeni yatan hastaların %20'nin integron pozitif bir suşla enfekte olduğunu gösteren bazı yayınlarda toplumun potansiyel bir kaynak olabileceği üzerinde durulmuştur (58). Ayrıca çiftlik hayvanlarında yapılan çalışmalarda hayvanlardan izole edilen bakterilerde belirlenen sınıf-1 integronlar ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki gösterilmiştir (52,55).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Görüntüleme cihazı (Gel/ChemiDoc XRS Biorad, CA, USA)
Thermal cycler (MBS Satellite Thermo, CA, USA)
Yatay elektroforez sistemi (Bio-Rad, CA, USA)
Kuru ısı bloğu (TDB-120 Thermo, CA, USA)
Mikropipet (0.5-10 µl) (Hamilton, GR, Switzerland)
Mikropipet (10-1000 µl) (Hamilton, GR, Switzerland)
Otomatize bakteriyel tanımlama ve duyarlılık sistemi VITEK 2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Boric acid (Merck, Darmstadt, Germany)
Ethylene diamine tetra acetic acid EDTA (Sigma, CA, USA)
Ethidium bromide (Sigma, CA, USA)
Agaroz (Bio-Rad, CA, USA)
Tris-hydrochloride (Appllichem, Darmstadt, Germany)
Trisma base (Sigma, CA, USA)
DNA Ladder (100 bp) (Fermentas, Vilnius, Lithuania)
DNA Ladder (100 bp) Plus (Fermentas, Vilnius, Lithuania)
6X Loading dye solution (Fermentas, Vilnius, Lithuania)
dNTP Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania)
Proteinase K (Sigma, CA, USA)
Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania)
PER-A primeri (T1b Molbiol, Berlin, Germany)
PER-D primeri (T1b Molbiol, Berlin, Germany)
ERIC-2 primeri (T1b Molbiol, Berlin, Germany)
3' -CS primeri (T1b Molbiol, Berlin, Germany)
5' -CS primeri (T1b Molbiol, Berlin, Germany)
Mueller-Hinton broth (Becton Dickinson, NJ, USA)
Mueller-Hinton agar (Merck, Darmstadt, Germany)

Kanlı ve EMB Agar (Salubris, CA, USA)

Antimikrobiyal ajan içeren diskler (Oxoid, Hampshire, England):

Seftazidim (30 µg)

Piperasilin (100 µg)

Aztreonam (30 µg)

Sefotaksim (30 µg)

Sefepim (30 µg)

İmipenem (10 µg)

Meropenem (10 µg)

Amoksisilin-klavulanik asit (30 µg)

Piperasilin-tazobaktam (100-10 µg)

3.1.3. Tamponlar

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

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

3.1.4. Besiyerleri

Mueller-Hinton Broth (MHB): 22 gr besiyeri tartılarak 1 lt distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda steril edilerek kullanıldı.

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

3.2. Yöntem

Ocak 2007-Mayıs 2008 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, VITEK2 Compact otomatize bakteriyel tanımlama ve duyarlılık testi sistemi ile tanımlanmış ve duyarlılık testleri yapılmış olan 179 seftazidim dirençli suş arasından rastgele sayılar tablosu yardımı ile seçilen farklı hastalardan izole edilen 100 adet *P. aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edildi.

3.2.1. *P. aeruginosa* Suşlarının Tiplendirilmesi

Çalışmaya alınan suşların, EMB agarda üreyen laktoz negatif kolonileri hareket, oksidaz aktivitesi, koloni morfolojisi, pigment oluşturma, kanlı agarda hemoliz oluşturma özellikleri gibi konvansiyonel yöntemler kullanılarak *P. aeruginosa* oldukları doğrulandı.

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

P. aeruginosa suşlarının seftazidim, piperasilin, aztreonam, sefotaksim, sefepim, imipenem ve meropenem duyarlılıkları, "Clinical and Laboratory Standarts Institute" (CLSI) önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı (15). Bu amaçla incelenecek suşların süspansiyonları, 18-24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerinden inokulum yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde hazırlanarak, steril bir eküvyonla MHA besiyerinin tüm yüzeyine homojen bir şekilde inoküle edildi. Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Besiyeri üzerine seftazidim, aztreonam, sefotaksim, sefepim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, imipenem, meropenem antimikrobiyal ilaç diskleri merkezleri arasındaki ve petrinin kenarına olan uzaklıkları 25 mm olacak şekilde yerleştirildi. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI sınır değerlerine göre yorumlandı.

3.2.3. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile GSBL Saptanması

GSBL varlığını belirlemek için seftazidime dirençli 100 adet *P. aeruginosa* suşunda çift disk sinerji yöntemi kullanıldı. MHA besiyeri yüzeyine 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Tarama testi için plakların merkezine amoksisilin-klavulanik asit diski ve çevresine merkezleri arasındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde aztreonam, seftazidim, sefepim ve piperasilin diskleri yerleştirildi. Amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru beta-laktam inhibisyon zon çapının genişlemesi GSBL pozitifliği olarak kabul edildi.

3.2.4. *P. aeruginosa* bakteri hücrelerinden DNA ekstraksiyonu

P. aeruginosa bakteri hücrelerinden DNA eldesi fenol-kloroform yöntemine göre yapıldı (23).

- MHA besiyeri üzerinde saf kültür halinde üretilmiş kolonilerden bir öze dolusu alınarak 2 ml steril Tris-HCl EDTA (TE) tamponu bulunan ependorf tüplerine konuldu. 30 saniye vortekslenerek süspansiyon homojen haline getirildi.
- 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilip üst sıvı atıldı. Pellet üzerine 0.2 mL TE tamponu ve 0.2 mL Proteinaz K solüsyonu eklenip dikkatlice karıştırıldı.
- Karışım 50°C'de 2 saat ile bir gece arasında inkübasyona bırakıldı.
- Bu aşamada solüsyon vizköz olduğundan pipetlemenin rahat yapılabilmesi için solüsyona 2 mL TE tamponu ekleyip iyice karıştırıldı.
- Karışımın 0.4 mL'si 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 0.4 mL fenol konularak karışım vortekslendi ve 11.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 0.4 mL kloroform eklenip vortekslendi ve 11.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine toplanan sıvı hacminin 1/10'u kadar 3M sodyum asetat ve iki katı kadar %100 alkol eklenip karıştırıldı.
- Karışım -20°C'de 30-60 dakika soğutuldu.
- 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü üst kısım atıldı.
- DNA pelleti üzerine 1 ml soğuk %70'lik ethanol eklenerek 14.000 g'de santrifüj edildi ve üst kısım alkol atıldı.

- DNA pelleti oda ısısında kurutulup üzerine 50 µl TE tamponu eklenerek dikkatlice homojenize edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.2.5. PZR Optimizasyonu

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

a. Magnezyum klorür optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda magnezyum klorür (MgCl₂) kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Magnezyum klorür optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7	Tüp 8	Tüp 9	Tüp 10
Saf su (µl)	27	26	25	24	23	22	21	20	19	18
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂ (µl)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10 mM dNTP (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10 pmol PER-A (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10 pmol PER-D (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Taq DNA polimeraz (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kalıp DNA (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

b. Primer bağlanma ısı optimizasyonu

PER-1 geni saptamak için kullanılan primerlerin bağlanma ısıları $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü ile hesaplandı. Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak, primer bağlanma ısı aralığının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapıldı. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7	Tüp 8	Tüp 9	Tüp 10	Tüp 11	Tüp 12
Bağlanma ısı (°C)	50.3	50.6	51.0	51.9	53.0	54.3	55.6	56.9	58.4	59.3	59.9	60.2
Saf su (µl)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂ (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
10 mM dNTP (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10 pmol PER A (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10 pmol PER D (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Taq DNA polimeraz (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kalıp DNA (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

3.2.6. PZR Yöntemiyle *blaPER-1*'in Amplifikasyonu

P. aeruginosa bakteri hücrelerinden elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak seftazidim direncine sebep olan *PER-1* geninin belirlenmesi için PER-A ve PER-D primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

a. Reaksiyon karışımı (50 µl):

10 X PZR tamponu	1X
25 mM MgCl ₂	2.5 mM
10 mM dNTP	2 mM
Taq DNA polimeraz	5 U
PER A primeri	10 pmol
PER B primeri	10 pmol
Kalıp DNA (50 ng)	2 µl
Saf su	23 µl
Toplam	50 µL

b. PER-1 gen bölgesi için amplifikasyon programı

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

c. DNA elektroforezi

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. 2 saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemini takiben örneklere ait DNA bantları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırılarak görüntüleme cihazında incelendi.

3.2.7. Seftazidim Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

PZR ile *PER-1* geni taşıdığı saptanan suşların seftazidim MİK değerleri, CLSI önerileri doğrultusunda, MHB besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak saptandı (15). Üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

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

“Enterobacterial repetitive intergenic consensus” (ERIC) dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PZR yöntemiyle suşlar arasındaki klonal ilişki araştırıldı (106).

a. Reaksiyon karışımı (50 µl):

10 X PZR tamponu	1X
25 mM MgCl ₂	2.5 mM
10 mM dNTP	2 mM
Taq DNA polimeraz	2.5 U
ERIC -2 primeri	25 pmol
Kalıp DNA (50 ng)	5 µl
Saf su	32.5 µl
Toplam	50 µL

b. RAPD-PZR amplifikasyon programı:

95° C' de 1 dakika	→	1 Döngü
94° C' de 1 dakika	}	30 Döngü
40° C' de 1 dakika		
72° C' de 1 dakika		
72° C' de 5 dakika	→	1 Döngü

c. Elektroforez:

Amplifikasyon ürünü (10 µl) ile 2 µl 6X yükleme solüsyonu karıştırılarak 1X TBE tamponu içerisinde bulunan %1'lik agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi. 120 volt'ta 90 dakika süreyle DNA bantları yürütüldü. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus kullanılarak belirlendi. RAPD yöntemiyle klonal yakınlıkları saptanan suşların dendogramları Biomerics version 5.10 yazılım sisteminde "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" yöntemi kullanılarak oluşturuldu.

3.2.9. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığının Araştırılması

blaPER-1 saptanan suşlarda, sınıf-1 integronların varlığı, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZR ile araştırıldı. Bunun sonucunda elde edilen veriler RAPD-PZR sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

a. İntegron-PZR karışımı:

10 X PZR tamponu	1X
25 mM MgCl ₂	3 mM
10 mM dNTP	200 µM
Taq DNA polimeraz	5 U
3'-CS primeri	100 pmol
5'-CS primeri	100 pmol
Kalıp DNA (50 ng)	5 µL
Saf su	27.5 µL
Toplam	50 µL

b. Amplifikasyon programı:

95° C 10 dk	→	1 Döngü
94° C 1 dk	}	30 Döngü
55° C 1 dk		
72° C 5 dk		
72° C 4 dk	→	1 Döngü

c. Elektroforez:

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için agaroz konsantrasyonu %1 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile jel hazırlandı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. 120 dk süresince 130 voltta moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0.5 µg/ml etidyum bromit içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemi takiben örneklere ait DNA bantları "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" belirteci kullanılarak görüntüleme cihazında incelendi.

3.2.10. PER-1 Enziminin Sınıf-1 İntegronlarla İlişisinin PZR ile Araştırılması

PER-1 enziminin integron kökenli olup olmadığını ortaya koymak için PER-1 enzimi saptanan farklı integron paternlerine sahip suşlarda, sınıf-1 integronların 5' korunmuş bölgesinde yer alan ve *attI* rekombinasyon bölgesine özgü 5'-CS primeri ile *blaPER-1* genine özgü PER-D primeri kombine edilerek hot start PZR tekniği ile aşağıdaki koşullarda PZR uygulandı.

a. Hot Start -PZR karışımı:

10 X PZR tamponu	1X
25 mM MgCl ₂	1.25 mM
10 mM dNTP	200 µM
Hot Start Taq DNA Polimeraz	1.5 U
5'-CS primeri	100 pmol
PER-D primeri	100 pmol
Kalıp DNA (50 ng)	5 µL
Saf su	32.2 µL
Toplam	50 µL

b. Amplifikasyon programı:

95 °C 5 dk	→	1 Döngü
94°C 1 dk	}	30 Döngü
50°C 1 dk		
72° C 1 dk		
72°C 5 dk	→	1 Döngü

c. Elektroforez:

PZR ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanan %1'lik agaroz jele yüklenerek, 45 dk. 120 voltta DNA bantları ayrıştırıldı. "GeneRuler TM 1 kb DNA Ladder" belirteci ile elde edilen bantların molekül büyüklüğü görüntüleme cihazında belirlendi.

5'-CS ve PER-D primerleriyle yapılan PZR sonucunda 1 kb'dan daha büyük bir ürün elde edildi. PER-1 enziminin varlığını belirlemek için PER-A ve PER-D primer çifti kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. *P. aeruginosa* suşlarında *blaPER-1*'e özgü yaklaşık 900 bp'lik bant oluşması, söz konusu suşlarda PER-1 geninin sınıf-1 integronla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer/Oligonükleotid Adı	Primer/Oligonükleotid Dizisi	Referans
PER-1 'e özgü primerler PER - A PER - D	5'- ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC-3' 5'- AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA-3'	18
Sınıf-I integronlara özgü primerler 5' - CS 3' - CS	5'- GGC ATC CAA GCA GCA AG-3' 5'- AAG CAG ACT TGA CCT GA-3'	59
ERIC-2	5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'	106

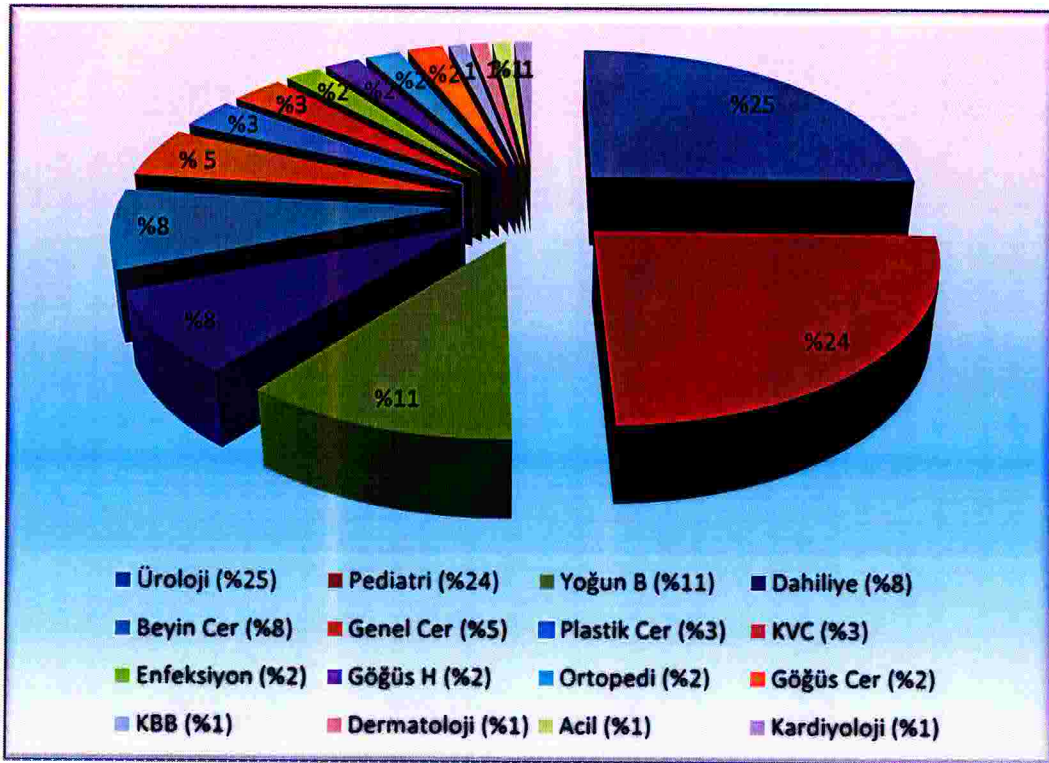
3.2.11. Çalışmada Kullanılan İstatistik Yöntemleri

- Suşların klonal yakınlıklarının değerlendirilmesi: RAPD-PZR sonuçlarına göre tüm bantları birebir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir ve iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak yorumlandı, grup analizleri yapıldı ve tüm izolatların bant profilleri göz önüne alınarak gruplar oluşturuldu. Bu grupları temsil eden birer suş seçilerek bant profilleri görüntülendi. RAPD yöntemiyle klonal yakınlıkları saptanan suşların dendogramları “Dice” katsayısı esas alınarak “Biomerics version 5.10” programında UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturuldu.
- Pearson χ^2 testi kullanılarak PER-1 geni içeren ve içermeyen suşlarda aztreonam, sefepim, sefotaksim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, imipenem ve meropenem direnç profili açısından farklılık araştırıldı.
- İntegron (+) ve (-) suşlar arasında seftazidim MİK değerlerinde farklılık olup olmadığı SPSS 15.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel analizlerde ölçümsel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Veriler normal dağılıma uymadığı için grupların ikili karşılaştırmasında “Mann-Whitney U” testi kullanıldı, istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

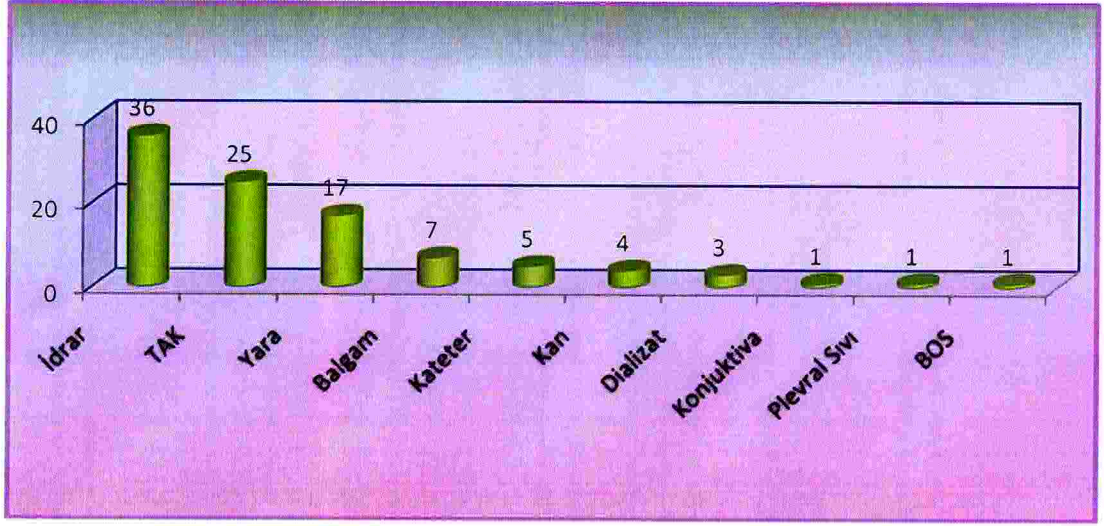
4. BULGULAR

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

Çalışmamızda Ocak 2007 – Haziran 2008 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 641 *P. aeruginosa* suşu içerisinde seftazidime dirençli olan 179 (%27) suş arasından rastgele 100 ayrı hastadan izole edilen hastane infeksiyonu etkeni seftazidim dirençli 100 adet *P. aeruginosa* suşu kullanıldı. Bu suşların izole edildikleri örnek türleri ile servisler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de oranlarına göre verildi.



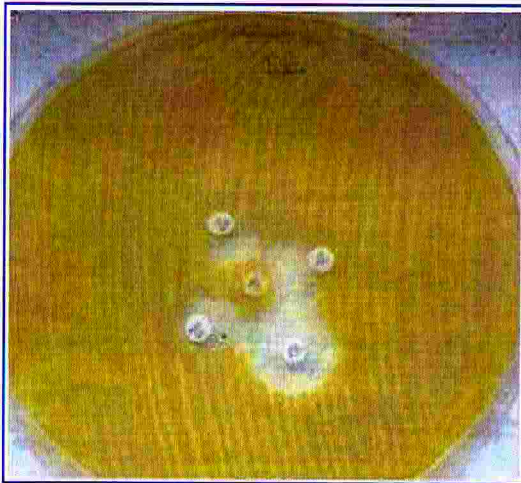
Şekil 4.1. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri servisler ve oranları



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

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Disk difüzyon duyarlılık testi sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* suşlarının aztreonam, sefepim, sefotaksim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, imipenem ve meropenem antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %100, %88, %100, %67, %43, %75 ve %70 olarak bulundu. Çift disk sinerji yöntemiyle 40 adet PER-1 enzimi taşıyan *P. aeruginosa* suşunun 20 tanesinde (%50) GSBL pozitifliği saptandı. Şekil 4.3'de GSBL pozitifliği örnek olarak gösterilmiştir.



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

4.3. PZR Optimizasyon Sonuçları

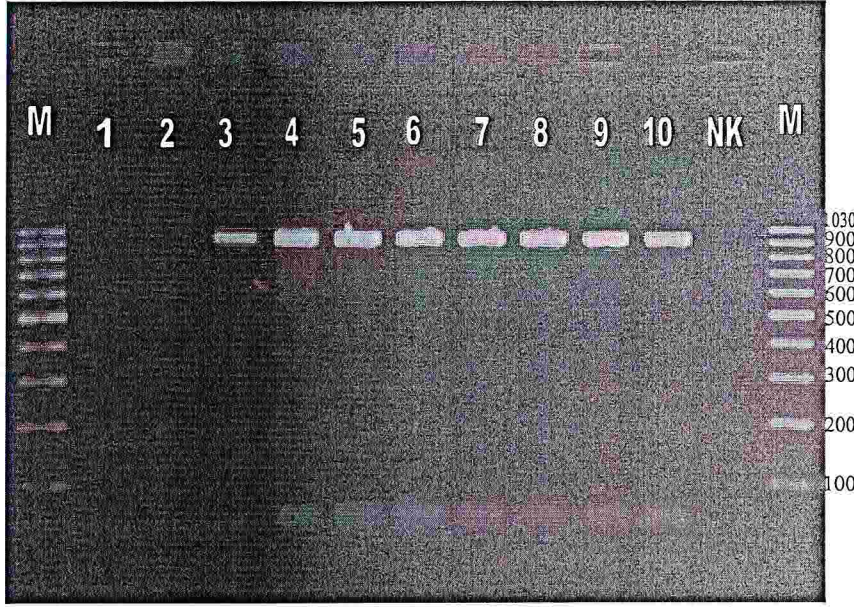
Seftazidim direnci saptanan 100 adet *P. aeruginosa* suşunda, PER-1 enzim varlığının belirlenmesinde kullanılacak olan PZR optimizasyon koşullarının sonuçları verilmiştir.

a. Magnezyum Klorür Optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan magnezyum klorür optimizasyonunda 1,5-6 mM konsantrasyon aralığı çalışıldı. *PER-1* enzimine spesifik PER-A ve PER-D primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmelerinde, en iyi bant profili veren 3.5 mM (5µl) MgCl₂ konsantrasyonu çalışmalarda kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonları Tablo 4.1'de, bant profilleri ise Şekil 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar

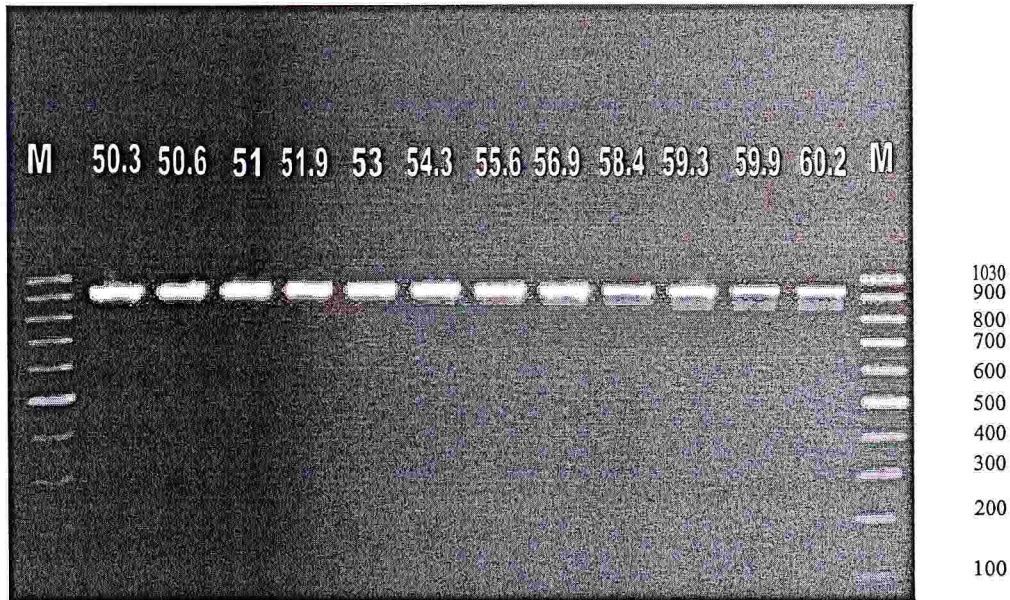
Magnezyum optimizasyonu	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7	Tüp 8	Tüp 9	Tüp 10
MgCl ₂ konsantrasyonu (mM)	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
25 mM MgCl ₂ miktarı (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



Şekil 4.4. *blaPER-1* için magnezyum klorür optimizasyonu ile oluşan 924 bp'lik bant profilleri (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

b. Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

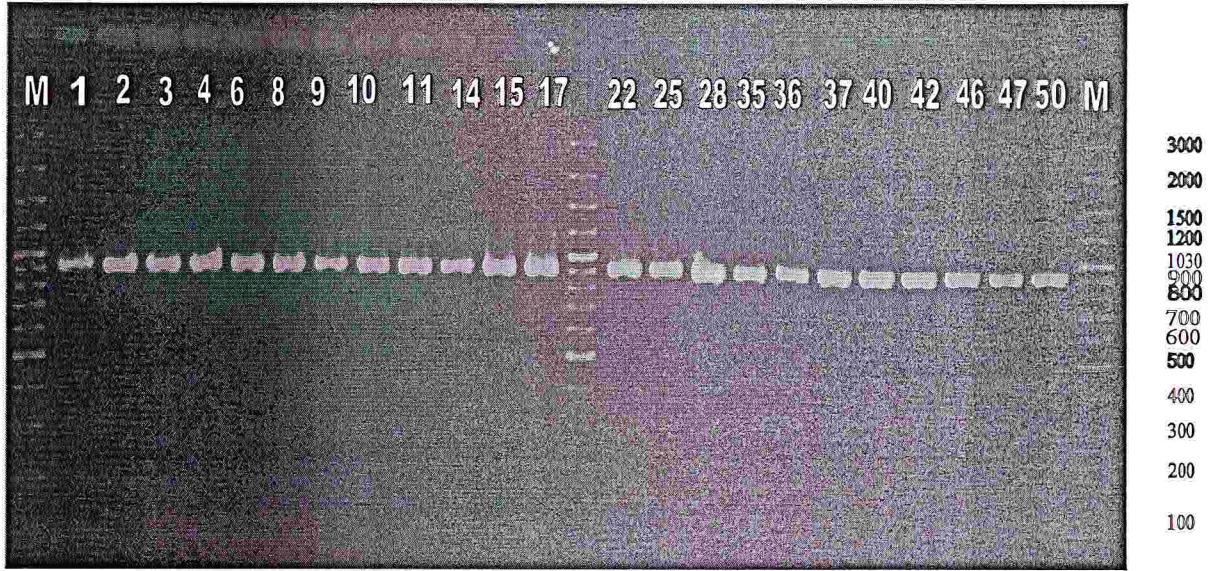
PER-1 enzimi primer bağlanma ısısının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında, 50-60 °C ısı aralığı kullanıldı. *PER-A* ve *PER-D* primerleri için en uygun bağlanma ısısı 56 °C olarak belirlendi. Belirli sıcaklık aralıklarında oluşan bant profili görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *PER-1* enzimi için primer bağlanma ısı optimizasyonu (M: Marker)

4.4. PZR Yöntemiyle *blaPER-1*'in Saptanması

P. aeruginosa suşlarında *PER-1* enzimini kodlayan gen varlığı *PER-A* ve *PER-D* primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlendi. Toplam 40 adet suşta 924 bp'lik *blaPER-1* saptandı ve jel görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verildi. *P. aeruginosa* suşları arasında *blaPER-1* sahip olanların oranı %40 olarak bulundu. *blaPER-1* içeren ve içermeyen suşlarda direnç profili açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.6. *P. aeruginosa* suşlarında saptanan 924 bp'lik *PER-1* gen bölgeleri



Şekil 4.7. *P. aeruginosa* suşlarında saptanan 924 bp'lik *PER-1* gen bölgeleri

Tablo 4.2. *blaPER-1*; (+) ve (-) suşlarda antibiyotik direnç profili

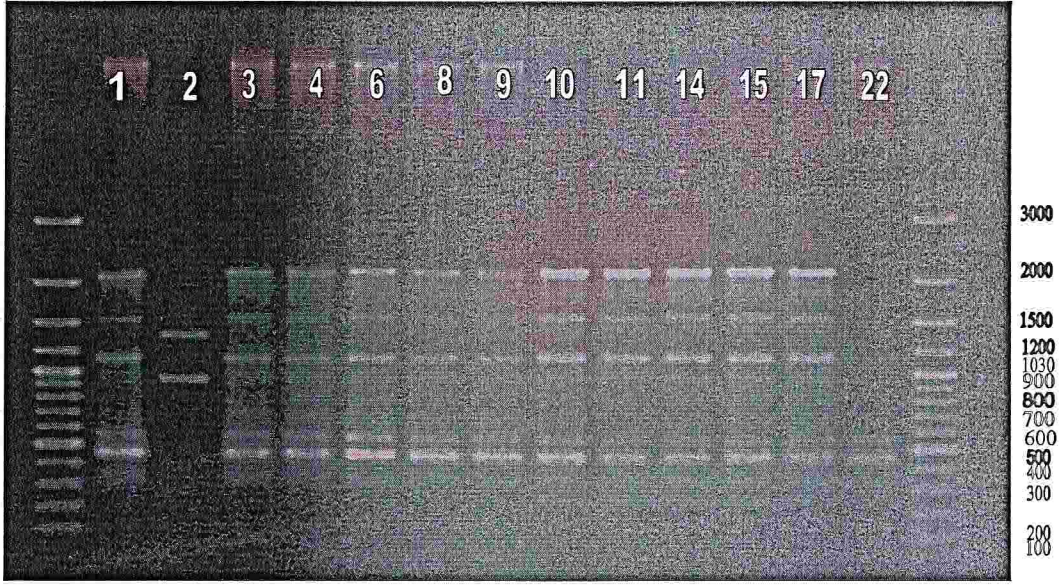
Antibiyotik	<i>PER(+)</i> Direnç Oranı %	<i>PER(-)</i> Direnç Oranı %
TZP	42.5	45
FEP	95	90
PRL	65	65
CTX	100	100
MEM	60	58.5
ATM	100	100
IPM	70	68.3

4.5. PZR Yöntemi ile *blaPER-1* Taşıdığı Belirlenen Suşların Seftazidim MİK Değerleri

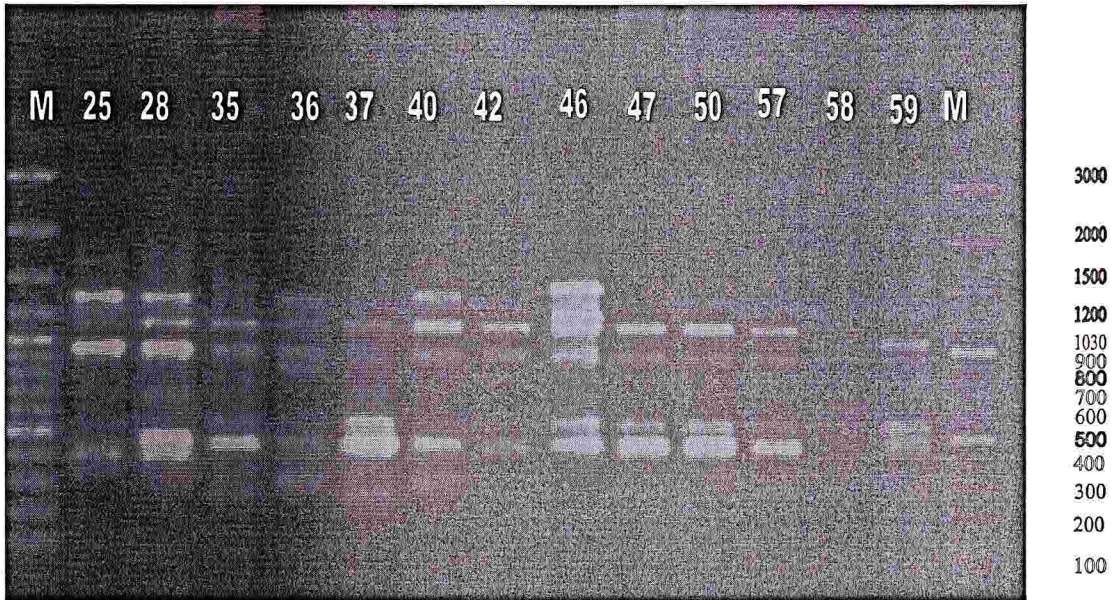
blaPER-1 taşıdığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarının seftazidim MİK değerleri CLSI kriterlerine göre yorumlandı. CLSI önerilerine göre *P. aeruginosa* için seftazidim MİK değeri ≥ 32 olduğunda dirençli olarak kabul edilmektedir. Çalışmada kullanılan tüm suşların seftazidim MİK değerleri ≥ 64 ve üzeri olarak belirlenerek dirençli oldukları doğrulandı ve bunların MİK değerleri Tablo 4.3’de verilmektedir.

4.6. *P. aeruginosa* Suşlarının Klonal Yakınlıkları

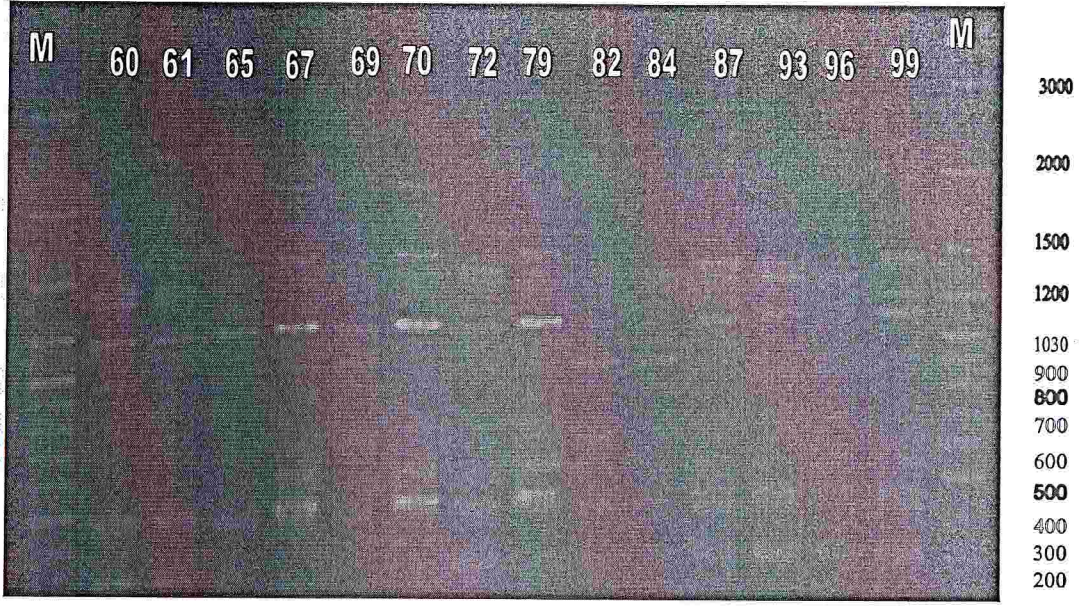
blaPER-1 saptanan *P. aeruginosa* suşlarının klonal yakınlıkları, ERIC dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PZR ile incelendi ve Şekil 4.8, Şekil 4.9 ile Şekil 4.10’da oluşan bant profili görüntüleri verildi.



Şekil 4.8. *blaPER-1* tespit edilen 1-22 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları (M: Marker)

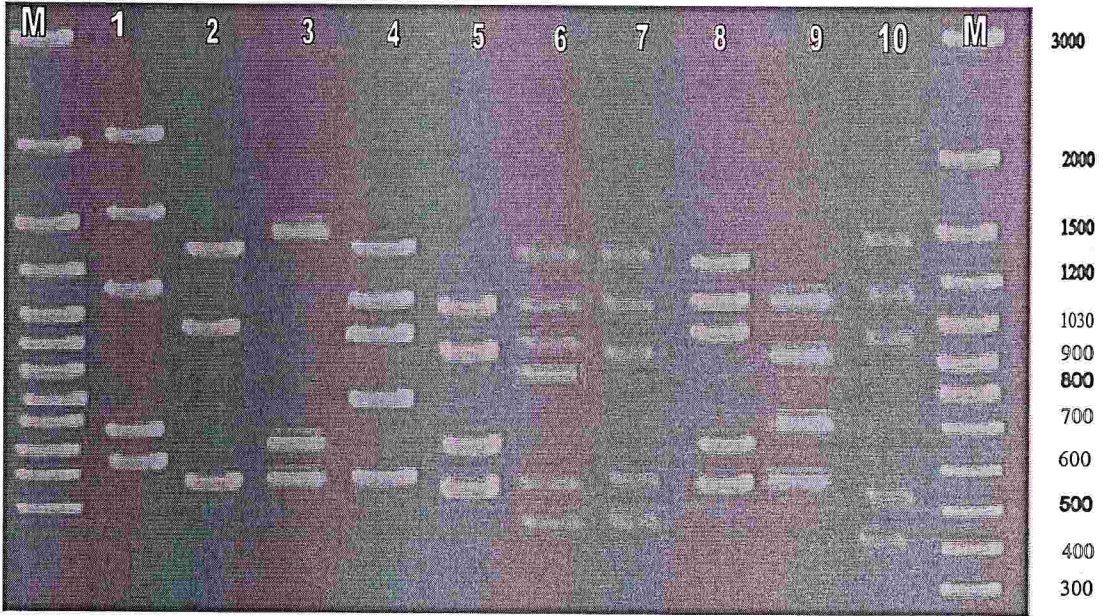


Şekil 4.9. *blaPER-1* tespit edilen 25-59 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları (M: Marker)

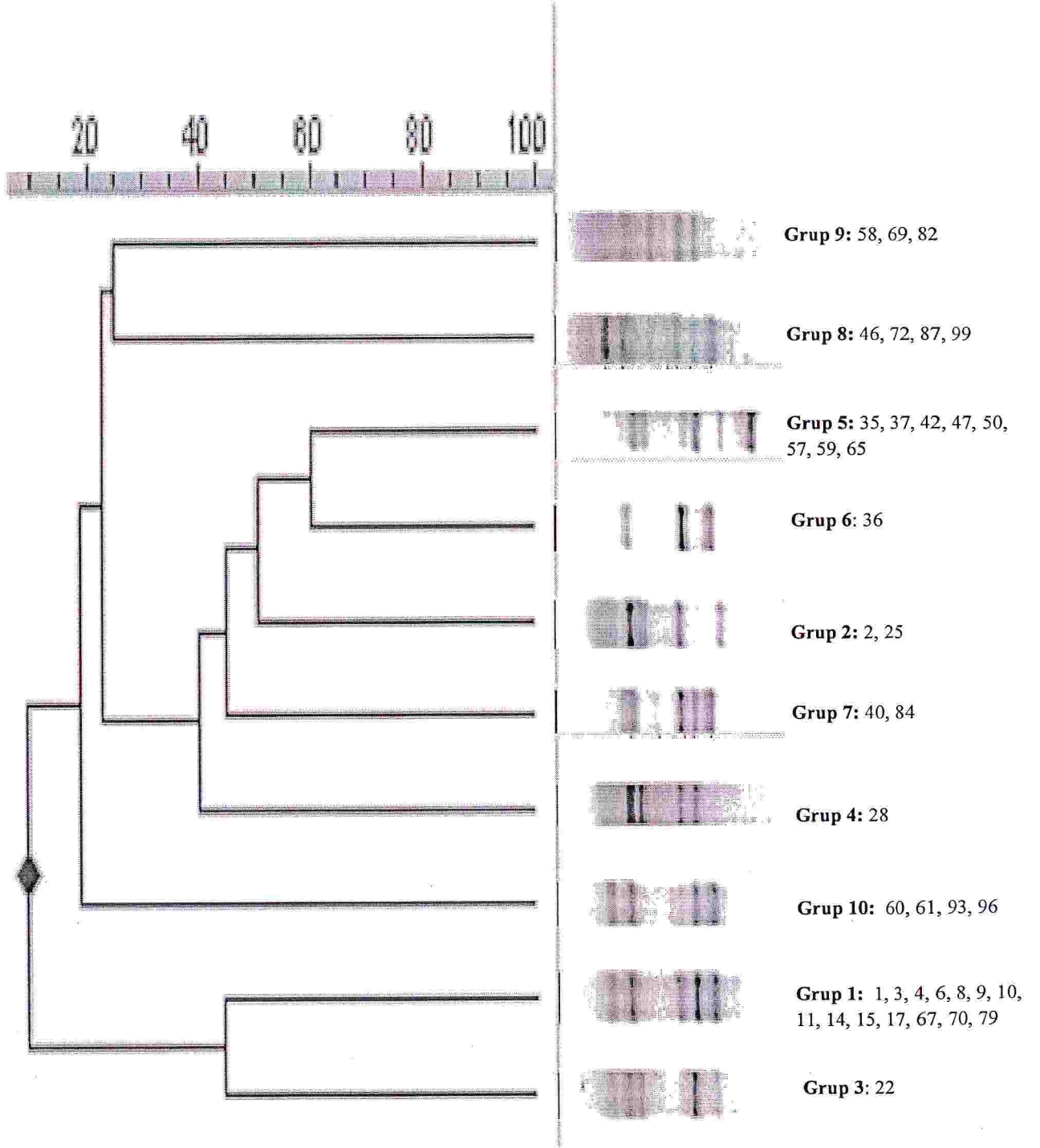


Şekil 4.10. *blaPER-1* tespit edilen 60-99 no'lu suşların RAPD-PZR sonuçları

Tüm suşlar bant profilleri göz önüne alınarak 10 grupta incelendi. Bu grupları temsil eden birer suş seçilerek bant profilleri Şekil 4.11'de gösterildi ve dendogram sonuçlarına Tablo 4.12'de yer verildi.



Şekil 4.11. *blaPER-1* tespit edilen *P. aeruginosa* suşlarının RAPD-PZR sonuçları ile oluşturulan grup profilleri



Şekil 4.12. *P. aeruginosa* suşlarının RAPD-PZR sonuçlarının dendrogramı

Tablo 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri-I

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

Tablo 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri-II

	Servis	Örnek Türü	ÇDST	Disk Difüzyon Duyarlılık Sonuçları								Seftazidim MİK Değerleri	PER-PZR	İntegron-PZR	RAPD-PZR
				CAZ	TZP	FEP	PRL	CTX	MEM	ATM	IPM				
51	Üroloji	İdrar		R	R	R	R	R	R	R	R				
52	Göğüs	Yara		R	R	R	R	R	R	R	R				
53	Enfeksiyon	İdrar	+	R	R	R	I	R	S	R	R				
54	Göğüs	Balgam		R	R	R	S	R	R	R	R				
55	Pediatri	İdrar		R	R	R	R	R	R	R	R				
56	Üroloji	İdrar		R	S	R	R	R	R	R	R				
57	Üroloji	İdrar	+	R	R	R	R	R	R	R	R	512-R	+	B	5
58	Pediatri	TAK		R	S	R	R	R	S	R	R	64-R	+		9
59	Erişkin YB	TAK		R	R	R	R	R	R	R	R	256-R	+	B	5
60	Beyin Cer.	İdrar		R	S	R	R	R	S	R	R	128-R	+		10
61	Beyin Cer.	İdrar	+	R	S	R	R	R	S	R	R	64-R	+		10
62	Pediatri	İdrar		R	S	R	R	R	R	R	R				
63	Göğüscer.	Balgam		R	S	R	S	R	R	R	R				
64	Ped	TAK	+	R	R	R	R	R	R	R	R				
65	Erişkin YB	TAK		R	S	R	R	R	R	R	R	256-R	+	B	5
66	Göğüscer.	Yara		R	R	R	R	R	R	R	R				
67	Üroloji	İdrar		R	S	R	R	R	R	R	R	64-R	+		1
68	Erişkin YB	TAK		R	R	R	R	R	R	R	R				
69	Dahiliye	Balgam	+	R	R	R	R	R	S	R	S	64-R	+		9
70	Üroloji	İdrar		R	R	R	S	R	R	R	R	512-R	+	A	1
71	Yeni D. YB	Kan		R	S	R	I	R	R	R	R				
72	Üroloji	İdrar		R	S	R	S	R	S	R	R	128-R	+	C	8
73	Ped. YB	TAK	+	R	S	R	R	R	R	R	R				
74	Üroloji	İdrar		R	R	R	R	R	S	R	S				
75	Genel Cer.	Yara		R	S	R	R	R	S	R	S				
76	Acil	TAK		R	S	R	S	R	S	R	S				
77	İnfeksiyon	Yara		R	S	R	R	R	R	R	R				
78	Pediatri	TAK	+	R	S	R	S	R	S	R	R				
79	Üroloji	İdrar		R	R	R	R	R	R	R	R	128-R	+	A	1
80	Göğüscer.	Kan		R	R	R	R	R	I	R	I				
81	Yeni D.	TAK		R	S	R	R	R	R	R	R				
82	Ped YB	İdrar	+	R	S	R	R	R	R	R	R	128-R	+		9
83	Beyin Cer.	İdrar		R	S	R	R	R	S	R	R				
84	Beyin Cer.	İdrar		R	S	R	R	R	S	R	R	128-R	+		7
85	Dahiliye	Balgam		R	S	R	R	R	S	R	S				
86	Pediatri	Kan		R	S	R	R	R	R	R	S				
87	Ped. YB	TAK	+	R	S	R	R	R	S	R	S	256-R	+	C	8
88	Göğüs Cer.	Exuda		R	S	R	R	R	S	R	R				
89	Dahiliye	İdrar		R	R	R	R	R	S	R	R				
90	Dahiliye	Dializat		R	R	R	R	R	S	R	R				
91	Üroloji	İdrar	+	R	R	R	R	R	R	R	R				
92	Cildiye	Yara		R	R	R	R	R	R	R	R				
93	Beyin Cer.	TAK		R	S	R	S	R	S	R	S	64-R	+		10
94	Plastikcer.	Yara		R	S	R	S	R	S	R	S				
95	Ped. YB	TAK		R	S	R	S	R	S	R	S				
96	Beyin Cer.	TAK	+	R	R	R	S	R	S	R	S	256-R	+		10
97	Ped. YB	Konjv.		R	S	S	S	R	S	R	S				
98	Beyin Cer.	İdrar		R	R	R	R	R	S	R	R				
99	Üroloji	İdrar		R	R	R	S	R	S	R	R	256-R	+	C	8
100	Ortopedi	Yara	+	R	S	R	S	R	S	R	R				

Tablo 4.4. *blaPER-1 (+) P. aeruginosa* suşlarının RAPD-PZR ve integron paternleri

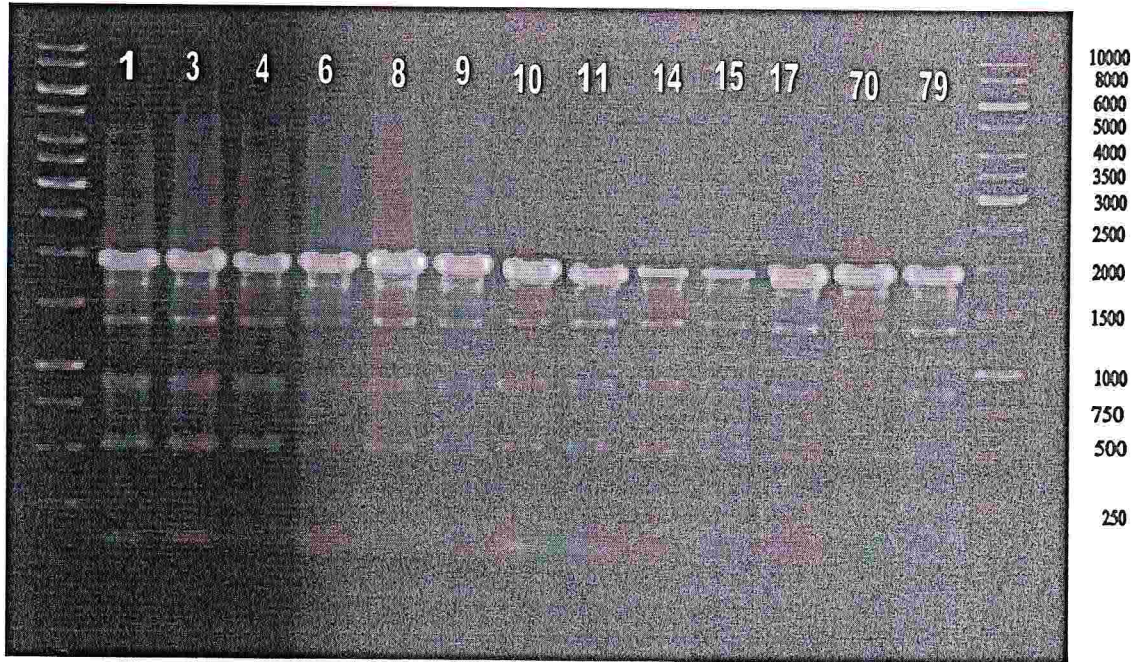
SUŞ NO	RAPD PROFİLİ	SERVİS	ÖRNEK TÜRÜ	İNTEGRON PATERNİ
1	1	Üroloji	İdrar	A
3	1	Üroloji	İdrar	A
4	1	Üroloji	Yara	A
6	1	Üroloji	İdrar	A
8	1	Erişkin YB	BOS	A
9	1	Üroloji	İdrar	A
10	1	Erişkin YB	Kateter	A
11	1	Üroloji	İdrar	A
14	1	Erişkin YB	TAK	A
15	1	Üroloji	İdrar	A
17	1	Erişkin YB	İdrar	A
67	1	Üroloji	İdrar	A
70	1	Üroloji	İdrar	A
78	1	Pediatrici	TAK	Negatif
25	2	Erişkin YB	Plevral sıvı	Negatif
2	2	Dahiliye	İdrar	Negatif
22	3	Erişkin YB	TAK	Negatif
28	4	Üroloji	İdrar	Negatif
35	5	Üroloji	İdrar	B
42	5	Erişkin YB	TAK	B
37	5	KVC	Yara	B
47	5	Üroloji	İdrar	B
50	5	Nöroloji	Balgam	B
57	5	Üroloji	İdrar	B
59	5	Erişkin YB	TAK	B
65	5	Erişkin YB	TAK	B
36	6	KVC	Yara	Negatif
40	7	Pediatrici	Yara	Negatif
84	7	Beyin Cer.	İdrar	Negatif
46	8	Dahiliye	İdrar	C
72	8	Üroloji	İdrar	C
87	8	Pediatrici	TAK	C
99	8	Üroloji	İdrar	C
58	9	Pediatrici	TAK	Negatif
69	9	Dahiliye	Balgam	Negatif
82	9	Pediatrici	İdrar	Negatif
60	10	Beyin Cer.	İdrar	Negatif
61	10	Beyin Cer.	İdrar	Negatif
93	10	Beyin Cer.	TAK	Negatif
96	10	Beyin Cer.	TAK	Negatif

Tablo 4.5. *blaPER-1* (+) *P. aeruginosa* suşlarında saptanan RAPD-PZR ve integron paternleri

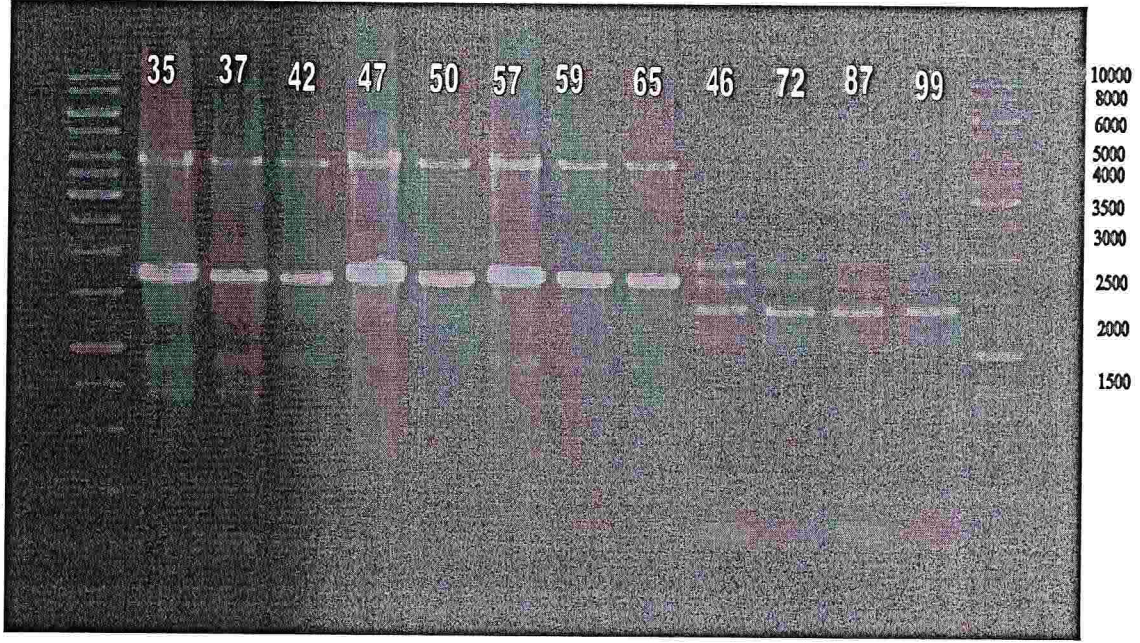
RAPD-PZR PATERNİ (suş sayısı)	1(14)	5(8)	8(4)	10(4)	9(3)	2(2)	7(2)	3(1)	4(1)	6(1)
İntegron Paterni (suş sayısı)	A(13)	B(8)	C(4)	İntegron Negatif						

4.7. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığı ve Epidemiyolojik Değeri

blaPER-1 saptanan suşlarda, sınıf-1 integronların varlığı ve epidemiyolojik değeri, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZR ile araştırıldı. *P. aeruginosa* suşlarında, sayıları 3-4, büyüklükleri ise yaklaşık 500 bp ile 4000 bp arasında değişen bantlar oluşmuştur (Şekil 4.12-Şekil 4.13). Bu veri, incelenen suşlarda sayı ve büyüklükleri farklılık gösteren birden fazla sınıf-1 integronun bulunduğunu işaret etmektedir. Bantlar farklılıklarına göre A, B, C olacak şekilde 3 paternde incelenmiştir.



Şekil 4.13. *P. aeruginosa* suşlarının integron-PZR A paternleri

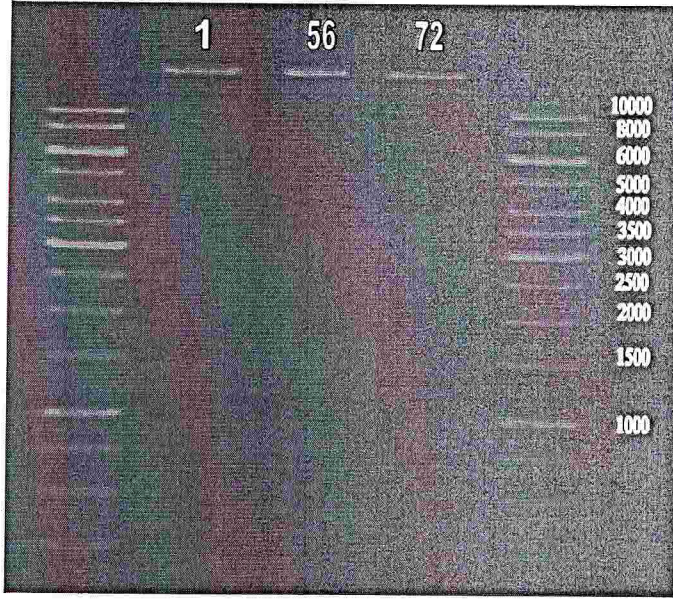


Şekil 4.14. *P. aeruginosa* suşlarının integrin-PZR B ve C paternleri

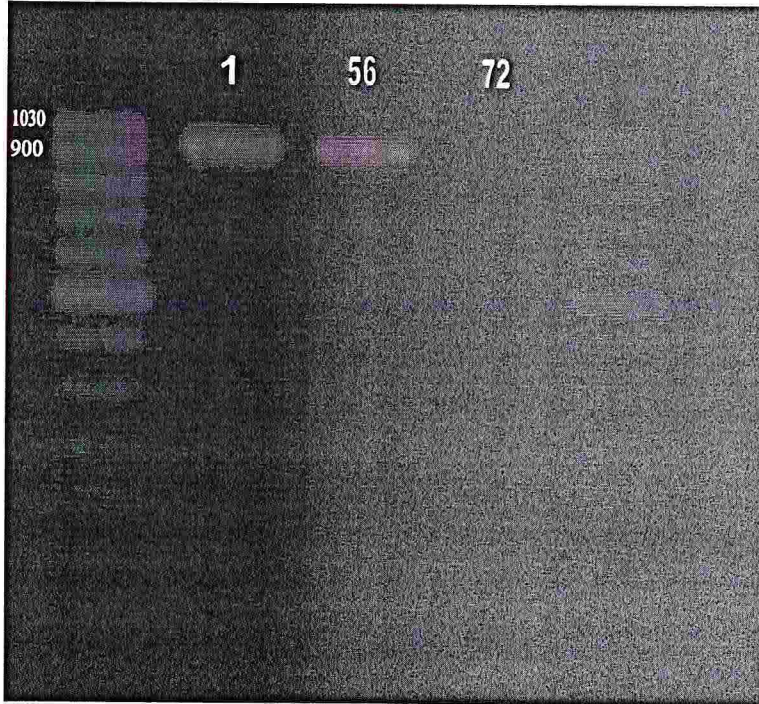
İntegron (+) ve (-) suşlar arasında seftazidim MİK değerlerinde anlamlı farklılık saptanmış, integrin içeren suşlarda seftazidim MİK değerleri yüksek bulunmuştur.

4.8. *blaPER-1*'in Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisi

blaPER-1 kaynağının integrin olup olmadığını anlamak amacıyla, *blaPER-1* pozitif bulunmuş, her ERIC-PZR paterninden seçilen örnek suşlarda, sınıf-1 integronların 5' korunmuş bölgesinde yer alan ve *attI* rekombinasyon bölgesine özgü 5'CS primeri ile *blaPER-1*'e özgü PER-D primeri kombine edilerek PZR yapıldı. Farklı integrin paternine sahip olan 3 *P. aeruginosa* suşunda 1 kb'dan büyük bir ürün olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Bu ürünlerin *blaPER-1* ait dizileri içerip içermediğini anlamak için 1 kb'dan büyük olan ürün kalıp olarak kullanılarak PER-A ve PER-D primerleriyle PZR gerçekleştirildi, sadece iki suшта *blaPER-1* spesifik yaklaşık 900 bp'lik ürünün olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. 1-56-72 no'lu suşlarda 5'CS ve PER-D primerleri ile gerçekleştirilen PZR ürünleri



Şekil 4.16. 1-56-72 no'lu suşlardan elde edilen 1 kb'lık ürünün kalıp olarak kullanıldığı PER-PZR sonuçları

5. TARTIŞMA

P. aeruginosa çoğunlukla hastane infeksiyonları etkeni olan önemli bir patojendir. Özellikle hastanede yatan ve immun sistemi çeşitli nedenlerle zarar görmüş olan hastalarda, pnömoni, üriner sistem infeksiyonu, bakteriyemi, yara infeksiyonları, malign otit, menenjit ve beyin apsesi, septik artrit ve osteomyelit, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, endokardit gibi klinik tablolara neden olmaktadır (30). *P. aeruginosa* oluşturduğu infeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Hastane infeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (33). Hastane infeksiyonlarında bu derece önemli bir etken olan *Pseudomonas* suşları ile oluşan infeksiyonların tedavisi her geçen gün daha da önemli bir sorun oluşturmaktadır (27). Monoterapi ve kombineterapide en etkili antipseudomal ajanlar beta laktamlardır. Major ilaç olan antipseudomal beta laktamlara karşı kazanılmış dirençte; efflux pompa sistemi, dış membran geçirgenliğinde azalma ve beta laktamaz üretimi rol oynar. Özellikle kazanılmış GSBL'lar *P. aeruginosa*'da önemli direnç mekanizmalarıdır. Bunlar arasında PER-1 enzimi görülme sıklığındaki artış ve mobil genetik elemanlarca aktarılabilmesi gibi nedenlerle son derece önemlidir (77). *P. aeruginosa* başta olmak üzere birçok gram negatif bakteride bulunabilen PER-1 enzimi TEM ve SHV türevi olmayan bir GSBL'dir. Seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonam gibi birçok beta-laktam ajana karşı direnç geliştirmektedir (102). PER-1 ilk kez 1991 yılında Paris'te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış, 1993 yılında ise Nordmann ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Nordmann P.1993).

P. aeruginosa kökenleri Aydın ve ark. tarafından yapılan çalışmada; en sık idrardan (%33.8), ikinci sıklıkta püydenden (%23.8) ve üçüncü sıklıkta yanık örneklerinden (%20.6) tespit edilmiştir (5). Turgut ve ark. yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* kökenlerini; %39.5 ile en sık idrardan ve %37.2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan, %20.6 ile üçüncü sıklıkta yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir (99). Akçay ve ark. çalışmalarında, *P. aeruginosa* kökenlerini %45 ile en sık trakeal aspirat örneklerinden, ikinci sıklıkta %23 ile idrar örneklerinden, üçüncü sıklıkta %21 ile yara örneklerinden elde etmişlerdir (1). Yücel ve ark. yaptığı bir çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerini en sık TAK ve idrardan (%22), ikinci sıklıkta yara yerinden (%15), üçüncü sıklıkta balgamdan (%14) izole etmişlerdir (112). Yaptığımız çalışmada; seftazidim

dirençli hastane infeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşları, en sık idrar örneklerinden (%36), ikinci ve üçüncü sıklıkta ise trakeal aspirat (%25) ve yara örneklerinden (%17) izole edilmiştir.

P. aeruginosa suşlarının servislere göre dağılımının incelendiği Bayramoğlu'nun çalışmasında; *P. aeruginosa* kökenleri en sık pediatri servisinden (%32.4), ikinci sıklıkta yoğun bakım ünitesi'nden (YBÜ) (%9.9), üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi servisinden (%7) elde edilmiştir (8). Gündüz ve ark. *P. aeruginosa* kökenlerini en sık YBÜ'den (%43.3), ikinci sıklıkta kulak burun boğaz servisinden (%18), üçüncü sıklıkta cerrahi servisinden (%8.6) saptadıklarını bildirmişlerdir (36). Kalem ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise *P. aeruginosa* kökenleri en sık YBÜ'den (%33), ikinci sıklıkta cerrahi kliniklerden (%22), üçüncü sıklıkta pediatri servisinden (%16) bildirilmiştir (51). Elde ettiğimiz sonuçlara göre *P. aeruginosa* suşları en sık üroloji servisinden (%25), ikinci sıklıkta pediatri servisinden (pediatri yoğun bakım, pediatrik cerrahi, pediatrik infeksiyon ve pediatrik kardiyoloji) (%24) ve üçüncü sıklıkta erişkin yoğun bakım ünitesinden (%11) izole edilmiştir.

Kolaylı ve ark.'nın yedi farklı üçüncü basamak sağlık kuruluşunun yoğun bakım ünitelerinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında PER-1 tipi beta-laktamaz enziminin sıklığını saptamak amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada IPM, FEP ve ATM antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %60.9, %91.3 ve %98.9 olarak tespit edilmiştir (54). Aktaş ve ark. hastane infeksiyonu etkeni olan 287 *P. aeruginosa* suşunda direnç oranlarını; seftazidime %39, imipeneme %98, aztreonama %92, sefepime %96, piperasiline %41 ve piperasilin-tazobaktama %37 olarak bildirmişlerdir (3). Bizim çalışmamızda da aztreonam, sefepim, sefotaksim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, imipenem ve meropenem antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %100, %88, %100, %67, %43, %75 ve %70 bulunmuştur. Tüm bu sonuçlara göre ülkemizde seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'ların diğer beta-laktam antibiyotiklere de önemli oranda dirençli olduğunu söylemek mümkündür.

Vahaboğlu ve ark.'ı hastane infeksiyonu etkeni olan ve farklı 8 üniversite hastanesinden izole edilen 367 *P. aeruginosa* suşunda seftazidim ve gentamisine yüksek oranlarda direnç, imipenem ve meropeneme de düşük oranlarda direnç tespit etmişlerdir (104). Zarakolu ve ark. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden izole ettikleri 174 *P. aeruginosa* suşunun %74'ünde çoklu ilaç direnci bulurken en etkili antibakteriyel ajanların sırası ile piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin ve meropenem olduğunu

saptamışlardır (114). Kolaylı ve ark.'nın 2005 yılında gerçekleştirdiği çok merkezli bir çalışmada; PER-1 enzimi (+) ve (-) suşlarda çoklu direnç fenotipi açısından önemli farklılıklara rastlanmazken (54), Luzzaro ve ark. PER-1 enzimi taşıyan suşlarda piperasiline, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere karşı yüksek direnç oranları tespit etmişler, PER-1 enzimi içermeyen suşların sözü edilen antibakteriyel ajanlara duyarlı olduklarını ve GSBL pateni sergilemediklerini bildirmişlerdir (63). Hastanemizde izole edilen hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direncinin yanı sıra PRL, TZP, ATM, CTX, IMP, MEM ve FEP antibiyotiklerine direnç ve GSBL üretimi gibi özellikler incelenmiş, PER-1 geni taşıyan ve taşımayan suşlarda direnç profili açısından anlamlı bir fark görülmemiş, seftazidim dirençli suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu, incelenen ajanlar içinde en etkili olanların ise piperasilin ve piperasilin-tazobaktam olduğu belirlenmiştir.

İnan ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada; 105 *P. aeruginosa* suşunun %12'de ÇDST ile GSBL pozitifliği saptamıştır. Çalışmaya dahil edilen çoklu direnç fenotipi gösteren 50 suşda ÇDST ile %18 oranında GSBL pozitifliği bulunurken, PZR ile yapılan çalışmada %96 GSBL pozitifliği saptanmıştır (50). Eraç B. tarafından yapılan çalışmada; CAZ, FEP, CTX, AMC ve ATM diskleri ile GSBL varlığı araştırılmış, bu şekilde PER-1 gen varlığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarında %83.3 oranında GSBL pozitifliği tespit edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çoklu dirençli 50 *P. aeruginosa* suşunun incelendiği diğer bir çalışmada, ÇDST ile %18 oranında GSBL pozitifliği saptanırken, PZR yöntemiyle %44 oranında PER-1 geni varlığı tespit edilmiştir (17). Çalışmamızda incelenen suşlarda CAZ, FEP, ATM ve PIP diskleri ile AMC diski kullanılarak GSBL varlığı araştırıldı ve bu şekilde 40 adet PER-1 (+) *P. aeruginosa* suşunun 20'sinde (%50) GSBL pozitifliği saptandı. Tüm bu sonuçlardan hareketle *P. aeruginosa*'da GSBL varlığı araştırılırken ÇDST'nin yetersiz olduğunu söylemek mümkündür. ÇDST ile GSBL pozitif olan 20 suşda PZR ile PER-1 (+)'liğinin gösterilmesi, ÇDST'nin hatalı pozitif sonuç vermediğinin ancak hatalı negatif sonuç verebileceğinin göstergesidir. GSBL tanısında çift disk sinerji yöntemi *Pseudomonas*'lar için standardize edilmediğinden ÇDST ile yalnızca tahmini GSBL yorumu yapılabilir. GSBL yorumu yapılabilir.

PER-1'in tanımlanması amacı ile yapılan birçok çalışmada, fenotipik yöntemler olarak İEO, antibiyogram paterni/çift disk sinerji testleri; genotipik yöntemler olarak da koloni hibridizasyon, PZR, dizi analizi gibi testler birlikte kullanılmıştır (24,73,102). TEM ve SHV türevi olmayan PER-1 enziminin daha çok *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi çoklu dirençli hastane infeksiyonu etkeni suşlar tarafından sentezlenmesi ve bu suşlarda aynı zamanda; AmpC tipi enzimlerin aşırı üretimi, metallo beta-laktamazlar, OXA türevleri gibi farklı grup β -laktamaz enzimlerin eş zamanlı ekspresyonu, dış membran geçirgenliğinde azalma, aktif pompa sistemleri gibi direnç mekanizmalarının da varolabilmesi nedeni ile PER-1 enziminin fenotipik yöntemler ile taranması güçtür. İEO tekniği; TEM-1 gibi beta-laktamazların izoelektrik noktalarının PER-1'e çok yakın oluşu ve çevre faktörlerine duyarlı bir yöntem olması nedeniyle tanımlamada tek başına kullanılamamaktadır. PER-1'in belirlenmesinde tercih edilen yöntemler daha güvenilir olmaları nedeniyle PZR ve dizi analizi yöntemleridir (107).

PER-1 enzimi, ilk kez 1991 yılında Fransa'da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (74). Danel ve ark 1991-1993 yılları arasında Ankara'da, seftazidim dirençli 14 *P. aeruginosa* suşunda İEO, koloni hibridizasyon, PZR ve dizi analizi yaparak PER-1 enzimine rastlamışlardır (18). Vahaboğlu ve ark.'nın PER-1 prevalansını araştırmak amacıyla 3 aylık bir periyotta ülkemizin farklı bölgelerindeki 8 üniversite hastanesini kapsayan çalışmalarında; *P. aeruginosa* (367), *Acinetobacter* spp.(72) ve *K. pneumoniae* (92) türlerinde koloni hibridizasyon ve İEO tekniklerini kullanılarak *P. aeruginosa*'da %11, *Acinetobacter* spp.'de %46 oranında PER-1 pozitifliğini belirlerken, *K. pneumoniae* suşlarının hiçbirinde PER-1 enzimi tespit edememişlerdir (102). Ülkemizde üç farklı hastaneden üç aylık bir süreçte izole edilmiş hastane kaynaklı *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında, PER-1 pozitifliği oranı sırasıyla %23,7 ve %62 olarak tespit edilmiştir (105).

Orta Fransa'da 2001-2002 yılları arasında 9 hastanenin katılımıyla gerçekleştirilen çalışmada, toplam 5304 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşundan 37'sinde (%0.7) *blaPER-1* varlığı tespit edilmiş, birçok merkezde salgınlara neden olan bu suşlardan çoğunun aynı ya da benzer genotipik profile sahip oldukları ortaya konmuştur (19). Kuzey İtalya'da 1995-2000 yılları arasında altı hastaneden izole edilen, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli, ÇDST ile GSBL pozitifliği saptanmış ve nozokomiyal salgın etkeni olan 44 *P. aeruginosa* suşundan 20

tanisinin PER-1 enzimi ürettiği belirlenmiştir (77). Aktaş ve ark.'na ait farklı bir çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım servislerinden 1999-2000 yılları arasında izole edilmiş *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direncinden sorumlu olabilecek PER-1 enzim oranı %86, OXA-10 enzimi oranı %55, PER-1 ve OXA-10 enzimi birlikteliği %48 oranında bildirilmiştir (3). Bu oran, günümüze kadar seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında saptanmış en yüksek PER-1 enzim üretim oranıdır. İncelenen suş sayısının kısıtlı olması, *blaPER-1(+)* suşların %60'ının iki farklı klonun üyesi olması ve sadece yoğun bakım kaynaklı suşların incelenmesi gibi etkenler PER-1 oranında belirgin bir yüksekliğe neden olabilir. Kolaylı ve ark. 2005'te 7 farklı üniversite hastanesi yoğun bakım servisinden izole edilen 92 adet *P. aeruginosa* suşunda, İEO ve PZR teknikleri ile PER-1 oranını %55 bulmuşlardır (54). Zarakolu ve ark.'nın Hacettepe Üniversitesi'nden yaptıkları bir başka çalışmada; hastane infeksiyonu etkeni olan 67 *P. aeruginosa* suşunda %22.7 oranında *blaPER-1* saptanmış, PFGE'de 8 farklı patern gözlenmiştir (115). Mirsalehian ve ark. İran'da yaptıkları bir çalışmada, 170 *P. aeruginosa* suşunun 148'inde çoklu ilaç direnci bulurken 67 suшта GSBL pozitifliği saptamış, bunun da %49'unun PER-1 enzimi olduğunu göstermişlerdir (68).

Hastanemizde *blaPER-1*'e özgü primerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarına göre; hastane etkeni seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında %40 oranında *blaPER-1* varlığı tespit edilmiştir. *blaPER-1* taşıyan suşlardan hiçbirinde seftazidim MİK değerinin 64 µg/ml'nin altında olmaması bu enzimin seftazidime karşı yüksek etkinliği olduğunu ortaya koymaktadır.

PER-1 grubu enzim üreten suşların klonal yakınlıklarını ve epidemiyolojik özelliklerini saptamak için yapılan çalışmalar arasında; Kolaylı ve ark.'ı 92 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşundan PER-1 enzimi taşıyan 7 suшта ERIC-PZR ile klonal ilişki araştırılmış ve PER-1 enziminin multiklonal yayılım gösterdiğini rapor etmişlerdir (54). İstanbul Üniversitesi Hastanesi'nde *blaPER-1* içeren 42 *P. aeruginosa* suşunun klonal yakınlığının ERIC-PZR ile araştırıldığı diğer bir çalışmada; 16 farklı bant paterni saptanmış, bu suşlardan 25'inin (%60) iki farklı paternin üyesi olduğu anlaşılmış ve hastalar arasında klonal olarak ilişkili suşların yayıldığı sonucuna varılmıştır (3). Eraç ve ark. 2007'de PER-1 tipi GSBL enziminin gram negatif bakterilerde moleküler epidemiyolojisini araştırdıkları bir çalışmada, *blaPER-1* varlığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarının ERIC-PZR yöntemiyle, başlıca iki klonun üyesi oldukları anlaşılmıştır. Elde edilen veriler PER-1 enzim prevalansının yüksek oluşundan büyük ölçüde klonal

yayılım gösteren *P. aeruginosa* suşlarının sorumlu olduğunu düşündürmektedir (25). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının klonal ilişkilerini saptamak için yaptığımız bu çalışmada; 10 farklı bant paterni tespit edilmiş ve bu suşların başlıca dört klonun üyesi oldukları sonucuna varılmıştır. RAPD-PZR yöntemiyle Grup 1 (n:14), Grup 5 (n:8), Grup 8 (n:4), Grup 10 (n:4) ana klonlarının yanı sıra birkaç suş içeren alt gruplar belirlenmiştir. Bu verilere göre *P. aeruginosa* suşlarının 22'sinin (%55) iki farklı paternin üyesi olduğu ve bu ana paternlerde yer alan suşların büyük çoğunluğunun üroloji ve erişkin yoğun bakım servislerindeki hastaların idrar ile TAK örneklerinden izole edildikleri tespit edilmiştir (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5). Hastanemizde *blaPER-1* prevalansının yüksek olmasının büyük ölçüde klonal yayılımla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

İntegronlar, antibiyotik direnç gen kasetlerinin bölgeye özgü rekombinasyon ile bakteri içerisine girmesini sağlayarak özellikle gram negatif bakterilerde antibiyotik direncinin yayılmasından sorumlu hareketli genetik yapılardır. Direnç genlerinin yayılımında bu derecede önemli rol oynayan sınıf-1 integronları saptamak için yapılan çalışmalar arasında 1998'te Martinez ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada; *P. aeruginosa*'da sınıf -1 integron oranı yaklaşık %11 bulunmuş, gen kasetlerinin yaklaşık 450 bp büyüklüğünde olduğu, integron taşıyan suşlarda seftazidim ve aztreonam antibiyotik direnç oranlarının istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (64). Severino ve ark. Brezilya'da YBÜ'den izole edilen çoklu ilaç direnci gösteren 85 *P. aeruginosa* suşunda, sınıf-1 integron oranını %63 bulurken bazı suşlarda 5 gen kasetlerinin varlığını göstermiş, gen kasetlerinin büyüklüğünün 200-3000 bp arasında değiştiğini integron (+) suşlarda istatistiksel olarak seftazidim, imipenem, siprofloksasin, gentamisin direnç oranlarının integron (-) suşlara oranla çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (95). Brezilya'nın konu ile ilgili ilk çalışmasını yapan Fonseca ve ark. 2005'te, 106 *P. aeruginosa* suşu ile sınıf-1 integron varlığını %41.5 suşa gösterirken bunun %34'ünün gen kaseti taşımadığına işaret etmişler, gen kaseti taşıyanlarda kasetlerin büyüklüğünün 800 bp ile 3 kb arasında değişkenlik gösterdiğini saptamışlardır (29). Gu Bing ve ark. 2007'de iki yıllık bir periyotta 4 farklı merkezden rastgele seçtikleri 98 *P. aeruginosa* suşundan 40 tanesinde sınıf-1 integron tespit etmişler, suşlarda anlamlı derecede aminoglikozit, kinolon ve beta laktam antibiyotiklere direnç göstermişlerdir (32). Xu ve ark. 118 imipenem dirençli *P.*

aeruginosa'da 74 suşta sınıf-1 integron saptanmış, integron taşıyan suşlarda çoklu ilaç direnç oranını %93.2, taşımayan suşlarda ise bu oranı %18.2 bulmuşlar, integronlarda 879 bp ile 2655 bp büyüklüğünde 7 farklı gen kasetine rastladıklarını bildirmişlerdir (111). Dokuz Eylül Üniversitesi'nde 6 yıllık bir periyotta CAZ dirençli 117 *P. aeruginosa* suşunda sayıları 4-10, büyüklükleri ise yaklaşık 4000 bp ile 100 bp arasında değişen gen kasetlerine sahip integronlar saptanmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının ERIC-PZR yöntemiyle, büyük çoğunluğunun başlıca 2 klonun üyesi oldukları anlaşılmış, *blaPER-1* saptanan *P. aeruginosa* suşlarında 12 farklı integron paterninin olduğu saptanmıştır. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında farklı ERIC-PZR paternleri sergileyen suşların genelde farklı integron içeriklerine sahip oldukları gözlenmiştir (25). Pek çok çalışmada da, aynı genotipe sahip suşlarda farklı integronlar saptandığı gibi, farklı genotiplere sahip ilişkisiz suşlarda da aynı integrona rastlanmıştır (91). Bu bilgiler ışığında, hastanemizde izole edilen *blaPER-1* pozitif suşlarda, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler ile elde edilen PZR sonuçlarında, 3 farklı integron paternine sahip 25 adet *P. aeruginosa* suşu saptanmıştır. Bu suşlarda sayıları 3-4, büyüklükleri ise yaklaşık 500 bp ile 4000 bp arasında değişen gen kasetlerine sahip integronlar tespit edilmiştir. İntegron PZR ile ERIC-PZR sonuçları karşılaştırılmış, 1 suş dışında integron paterni ile ERIC-PZR paternlerinin uyumlu olduğu sonucuna varılmış ve uyumsuz olan suşta integron paternine rastlanmamıştır. İntegron (+) suşlarda seftazidim MİK değerleri integron (-) suşlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur.

Birçok çalışmada TEM veya SHV türevi olmayan GSBL'ler grubunda yer alan VEB, GES ve IBC gibi enzimlerin sınıf-1 integronların içeriğinde yer alan genler tarafından kodlandığı gösterilmiştir. Dubois ve ark. 2002 yılında *P. aeruginosa* suşlarında GES-1 enziminin sınıf-1 integronlar ile taşındığını bildirmişlerdir (22). Mavrodi ve ark. üriner sistem infeksiyonu etkeni 555 *P. aeruginosa* suşunda IBC enzim genlerinin sınıf-1 integronlar yardımı ile aktarıldığına işaret etmişlerdir (65). Poirel ve ark. 2003 yılında klonal olarak ilişkili 12 *P. aeruginosa* suşunda VEB-1 geninin integronla taşındığını bildirmişlerdir (82). PER-1 üreten çeşitli suşlarda gerçekleştirilen araştırmalarda, *blaPER-1*'in kromozomal veya plazmit kaynaklı olduğu ortaya konmuş ancak *blaPER-1* ile integronların ilişkisi gösterilememiştir (81). Eraç B. ve ark'ları yaptıkları bir çalışmada, 1 *P. aeruginosa* suşunda *blaPER-1*'in sınıf-1 integronlar üzerinde olduğunu göstermişlerdir (25). Benzer çalışmalar kaynak alınarak

hastanemizde izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında *blaPER-1* ile sınıf-1 integronların ilişkisi araştırılmıştır. Farklı RAPD-PZR paternlerine sahip *blaPER-1* taşıdığı saptanan 3 *P. aeruginosa* suşunda sınıf-1 integronların korunmuş bölgelerine ve *blaPER-1*'e özgü primerler kombine edilerek PZR uygulanmıştır. Üç *P. aeruginosa* suşunda yaklaşık 1 kb'lık bir ürün elde edilmesi ve bu ürünün kalıp olarak kullanıldığı PZR ile 2 suşda *blaPER-1*'e özgü yaklaşık 900 bp'lik bant oluşması; *blaPER-1*'in sınıf-1 integronla ilişkili olabileceğini göstermiştir.

blaPER-1'in integron gibi hareketli genetik elemanların yapısında yer alması, farklı türler veya aynı türün üyeleri arasında yayılımını hızlandırıcı bir rol oynamaktadır. Ayrıca *blaPER-1* ile ilişkili bulunan integronun yapısının aydınlatılması, moleküler direnç mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesine katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen, seftazidim dirençli hastane infeksiyonu etkeni olan 100 adet *P. aeruginosa* suşunda PER-1 enziminin varlığı araştırıldı
2. Bu suşların antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için yapılan ÇDST sonuçlarına göre; seftazidime dirençli olan *P. aeruginosa* suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu, incelenen ajanlar içerisinde piperasilin ve piperasilin-tazobaktamın en etkili antibiyotikler olduğu tespit edildi.
3. *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direncine sebep olan PER-1 enziminin belirlenmesi için PER-A ile PER-D primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi ve *blaPER-1* taşıma oranı %40 olarak saptandı.
4. *blaPER-1* saptanan suşlarda seftazidim MİK değerinin 64 µg/ml ve üzerinde olması PER-1 enziminin seftazidime karşı yüksek etkinliği olduğunu gösterdi.
5. ÇDST ile PER-1 (+) *P. aeruginosa* suşlarının yalnızca %50'sinde GSBL pozitifliği saptanması; çift disk sinerji testinin PER-1 tipi beta-laktamazların tanımlanmalarında yeterli ve güvenilir olmadığı sonucunu destekledi.
6. Suşların klonal yakınlıklarını tespit ettiğimiz RAPD-PZR sonuçlarına göre; %55 oranında endemik iki büyük klonun saptanması ve bu gruptaki suşların izole edildikleri servislerin benzer olması, *blaPER-1* içeren suşların klonal yayılım gösterdiğine işaret etmektedir. Bu durum, suşların yayılımını kontrol etmek için infeksiyon kontrol önlemlerine özenle uyulması gerektiğini ortaya koymaktadır
7. *blaPER-1* taşıyan suşlardaki antimikrobiyal direnç genlerinin yayılımında önemli rol oynayan sınıf-1 integronların varlığı PZR ile araştırıldı. Büyüklükleri 500 - 4000 bp, sayıları 3 ile 4 arasında değişen 3 farklı integron paterni tespit edildi.

8. *P. aeruginosa*'da farklı RAPD-PZR paternleri sergileyen suşların genelde farklı integronlar içerdikleri ve RAPD grup temsilcisi olan 2 suşda *blaPER-1*'in sınıf-1 integronla ilişkili olabileceği tespit edildi. Bu ilişkinin DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler kullanılarak desteklenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

PER-1 enziminin integronlar tarafından taşınması; antibiyotik direncinin hızlı yayılmasına ve farklı direnç genleriyle bir arada bulunma olasılığının artmasına yol açmaktadır. *blaPER-1* gibi direnç genlerinin taşınmasında rol oynayan genetik elemanların yapılarının aydınlatılması; moleküler direnç mekanizmalarının anlaşılmasına, tedavide başarısızlıkla sonuçlanan hastane infeksiyonları için kontrol önlemlerinin oluşturulmasına ve tedavi süreçlerinin düzenlemesine katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Akçay SS, Topkaya A, Oğuzoğlu N. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. *İnfek Derg.* 2003; 17: 465-469.
2. Akova M. Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. "İçinde" Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (yazarlar). *Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004: 85-94.
3. Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal Ç, Bauerfeind A. Hastanede yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *Escherichia coli* suşunda CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazın tanımlanması. *Mikrobiyol Bült.* 2005; 39: 421-429.
4. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Yohsuka S, Kato N, Ohta M.A. Novel integron like element carrying the metallo-beta-lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1612-1615.
5. Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. *Hastane İnfek Derg.* 2000; 4: 92-96.
6. Bahar G, Erac B, Mert A, Gulay Z. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. *J. Chemother.* 2004; 16: 343-346.
7. Baron EJ. and Finegold SM. St. Louis: The C. V. Mosby Company. *Diagnostic Microbiology*. 1990; 148-386.
8. Bayramoğlu G. Çesitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Meropenem Duyarlılıklarının Değişik Yöntemlerle Araştırılması. Samsun. Uzmanlık Tezi. 2004.
9. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram olumsuz Basiller. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları*. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi İzmir. 2000; 10: 175-197.
10. Bradford PA. Extended-spectrum Beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001; 14: 933-95.
11. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*. Stamford: Twenty-first Ed. 1998; 231-236.

12. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-second Ed, Appleton & Lange. 2001; 229-234.
13. Bunny K.L, Hall R.M, Stokes H.W. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, aac A7, and a chloramphenicol resistance gene, cat B3, n an integron in PbwH301. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 686-693.
14. Canton R, Teresa M, Coque And Fernando Baquero. Multiresistant Gram-negative bacilli: From epidemics to endemics. Current Opinion in Infectious Disease. 2003; 16: 315-325.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16, Pennsylvania. 2006.
16. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 155-162.
17. Çelik N. Çoklu dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında betalaktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. İstanbul. Doktora Tezi. 2007.
18. Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob Chemother. 1995; 35: 281-294.
19. De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, Plaidy A, Boyer M, Carroy E, Gbadamassi MC, Lалуque O, Poupart MC, Villemain M, Sirot J. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamase in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. J Antimicrob Chemother. 2004; 54: 634-639.
20. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G ve ark. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 910-911.
21. Dubois V, Poirel L, Marie C ve ark. Molecular characterization of a novel smif-1 integron containing blaGES-1 and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6')-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 638-645.

22. Dubois V, Debreyer C, Litvak S, Quentin C, Parissi V.A. New In Vitro Strand Transfer Assay for Monitoring Bacterial Sınıf-1 Integron Recombinase IntI1 Activity. PLoS one 2007; 2(12): 1315-1371.
23. Durmaz R, Ayan M. *Acinetobacter baumannii* suşlarının moleküler epidemiyolojisinde 'Arbitrarily Primed' PZR ve 'Pulsed -Field Gel' Elektroforezi. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001; 219-228.
24. Empel J, Filczak K, Mrowka A, Livermore D.M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 8: 2829-2834.
25. Eraç B. Hastane Kökenli Gram-Negatif Bakterilerde PER-1 Enziminin Moleküler Epidemiyolojisi. İzmir. Doktora Tezi. 2006.
26. Erdem B. Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (çeviri). Editör(ler), Mutlu G, Emir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999; 733-738.
27. Fidan I, Gürelik F. Ç, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. Ankem Derg. 2005; 19(2): 68-70.
28. Fluit A.C. and Schmitz F.J. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Rev. 2004; 10: 272-288.
29. Fonseca L.E, Vieira V.V, Cipriano R, Vicente A.C.P. Sınıf-1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2005; 44: 303-309.
30. Gayyurhan E, Zer Y, Mehlí M, Akgün S. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo beta laktamaz oranlarının belirlenmesi. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2008; 22 (1): 49-52.
31. Georgopapadakou N. Mechanisms of antibiotic resistance. In Principles and Practice of pediatrics infectious diseases, 2nd ed. 2003; 1253-1255
32. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Pan S, Zhao W. Prevalance and Characterization of sınıf-1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 1: 241-243.

33. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Türk Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E-Test ve Disk Diffüzyon Yöntemleri İle Araştırılması. Mikrobiyol Cem Derg. 2004; 34: 33-36.
34. Gülay Z. Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. In: Yüce A, Çakır N(eds) Hastane infeksiyonları.1.baskı İzmir. 2003; 87-120
35. Gülay Z, Sümerkan B. Antibiyotik Direnci: Mekanizma fenotip ilişkisi ve bildirimini. 5. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, İstanbul. 2002: 43-67.
36. Gündüz T, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, Algün Ü, Özbakkaloğlu B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının isepamisin ve amikasine duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003; 33: 232-235.
37. Gür D. B-laktamazların sınıflandırılması. *Flora* 1996; 2: 80-86.
38. Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2004: 5-13.
39. Hall M. R, Collis M. C. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*. 1995; 15(4): 593-600.
40. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinic Infectious Disease*. 1989; 27(Suppl 1): 93-99.
41. Haris A, Viera CT, Venkatamaran L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 1999; 28, 1128-1133.
42. Helfand S and Bonomo R. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: The impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant Gram- negative pathogens. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005; 5: 452-458.
43. Heritage J, M'Zali FH, Binzi DG, Hawkey MP. Evolution and spread of SHV extended β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 44: 309-318.

44. Hill B, Henry D.A, Speert P.D. *Pseudomonas*. Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th Edition. Volume 1 ASM Press Washington, D.C. 2007; 734-748
45. [http:// www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang](http://www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang)
46. [http:// www.biomaker.cdc.gov](http://www.biomaker.cdc.gov)
47. [http:// www.biyoloji.egitim.yyu.edu.tr](http://www.biyoloji.egitim.yyu.edu.tr)
48. [http:// www.canlilarbilimi.net/k/Konj/index.htm](http://www.canlilarbilimi.net/k/Konj/index.htm)
49. [http:// www.mmb.usyd.edu.au/coleman](http://www.mmb.usyd.edu.au/coleman)
50. İnan D, Saba R, Seyman D, Mamikoğlu L. Hastane infeksiyonu olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2004;18: 293-296.
51. Kalem F, Gündem N.S, Feyzioğlu B, Arslan U, Tuncer İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Ankem Derg*. 2008; 22(3): 123-126.
52. Kang S.G, Lee D.Y, Shin S.J, Ahn J.M, Yoo S.M. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and sınıf-1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *J Vet Sci*. 2005; 6(3): 201–205.
53. Karadenizli A, Vahaboglu H. Antibiyotik direnci ve klinik yansıması. In: Arman D,Uçan ES, editors. *Hastane kökenli pnömoni ve tedavisi*. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004, 73-92.
54. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Saniç A, Vahaboğlu H. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp, The Study Group dFEMS Microbiology Letters 249. 2005; 241–245.
55. L’Abee Lund, T.M. Sorum. Sınıf-1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb Drug Resist*. 2001; 7: 263-272.
56. Lartigue MF, Poirel L, Heriter C, Tolün V, Nordmann P. Firstdescription of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 315-316.
57. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel aquired metallo-beta-lactamase gene, *bla* (SIM-1), in a Sınıf-1 integron

- from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485- 4491.
58. Leverstein-van Hall M.A, Paauw A, Box A.T.A, Blok H.E.M, Verhoef J, Fluit A.C. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3038-3040.
 59. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.
 60. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001; 48, Suppl, S1: 87-102.
 61. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
 62. Livermore DM. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 634-640.
 63. Luzzaro F, Mantengoli E, Perili M ve ark. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β - lactamase. *J Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1865-1870.
 64. Martinez-Freijo, Fluit A.C., Schmitz F.J. Grek F.S.C., Verhoef J, Jones M.E. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds: *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 689-696.
 65. Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A ve ark. An integron-associated β -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum β -lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48: 627-630.
 66. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, Devault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Misra TK, Chakrabarty AM. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 191-206.

67. Mimoz O, Elhelali N, Leotard S ve ark. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1999; 44: 91-97.
68. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabamali F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended spectrum β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns. 2009; Jun.11.
69. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Pseudomonas* and related organisms. Med Microbiol. Fourth Ed. Mosby. 2002; 297-304.
70. Naas T, Poirel L, Nordmann P, Minör extended-spectrum β -lactamases. Clin. Microbiol Infect. 2008; 14: 42-52.
71. Nikaido H. Antibiotik resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. Clinical Infectious Diseases. 1998; 27 (Suppl 1): 32-41.
72. Nordmann P, Ronco E, Naas T ve ark. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 962-969.
73. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 44: 104-114.
74. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 37: 962-969.
75. Oh SJ, Lee SU, Hwang HY, Bae IK, Jo HS, Lee BH, Jeong SH. Prevalance of Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Korean J Lab Med. 2006; 6(1): 14-20.
76. Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L ve ark. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 1549-1552.
77. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, Daturi R, Romero E. Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase in Northern Italy. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(6): 2523–2529.

78. Pai H, Kim J, Lee J.H, Choe K.W, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 480-484.
79. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1-11.
80. Pier G, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*, "Principles and Practice of Infectious Diseases" (Ed. G. Mandel, J.E. Bennett, R. Dolin)'de, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia. 2005; 2587-2615.
81. Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic Environment and Expression of the Extended-Spectrum β -Lactamase *bla*PER-1 Gene in Gram-Negative Bacteria *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005; 5: 1708–1713.
82. Poirel L, Menuteau O, Agoli N et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3542-3547.
83. Poirel L, Girlich D., Naas T., Nordman P. OXA -28, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10 β -Lactamase from *P.aeruginosa* and Its Plasmid-and Integron-Located Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 2: 447-453.
84. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and Practise of Infectious Diseases, Fifth Ed. Eds, Mandell GR, Bennett JE, Dolin R. New York, Churchill-Livingstone Inc. 2000; 2310-2335.
85. Rice LB. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β - lactamases. *Chest* 2001; 119 (2): 391-396.
86. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9. Eds, Murray PH, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. Washington DC: ASM press; 2007; 1114-1145.
87. Recchia G. D. and Hall R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology.* 1997; 5(10): 389 -393.
88. Robert A. Bonomo1 and Dora Szabo. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43: 49–56.
89. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 4: 17-32.

90. Rowe-Magnus D.A. and Mazel D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current Opin. Microbiol.* 2001; 4: 565-569.
91. Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez De Anta MT, Vila J. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Sep; 9(9):907-11.
92. Sanders CC. Beta-lactamases of gram negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 1089-99.
93. Salyers AA and Witt DD. *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. *ASM Press*, Washington, D.C. 1994; 260-270.
94. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetics and Molecular Research.* 2003; 2: 48-62.
95. Severino P, Magalhaes V.D. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Research in Microbiology.* 2002; 153: 221-226.
96. Shi L, Zheng M, Xiao Z, Li L. Unnoticed spread of Sınıf-1 integrons in gram positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiol Immunol.* 2006; 50(6): 463-467.
97. Stürenburg E, Mack D. Extended Spectrum Beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47: 273-29.
98. Thompson R. R plasmid transfer. *J. Antimicrob Chemother* 1986; 18: 13-23.
99. Turgut H, Turhanoglu M, Çetin ÇB, Yalçın AN. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfek Derg.* 2002; 16: 63-66.
100. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora.* 2002; 7: 135-141.
101. Vahaboğlu H. ve Akhan SÇ. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* Türleri. *İnfeksiyon Hastlıkları ve Mikrobiyolojisi.* Cilt 2, Editör(ler), Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2002; 1008-1024.
102. Vahaboğlu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balık İ, Aydın K, Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and

- Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2265-2269.
103. Vahaboğlu H, Hall LM, Mulazımoğlu L, Dodanlı S, Yıldırım I, Livermore DM. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. *J Med Microbiol.* 1995; 43: 294-299.
 104. Vahaboglu H, Coşkuncan F, Tansel O et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) – producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 642-645.
 105. Vahaboğlu H, Sarıbas S, Akbas H, Öztürk R, Yücel A (1998). Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 269-270.
 106. Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* 1991; 19: 6823-6831.
 107. Weldhagen G.F. Integrons and β -lactamases- a novel perspective on resistance. *J Antimicrob Agents.* 2004; 23: 556-562.
 108. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler Class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2385-2392.
 109. White P. A, Mciver C, Rawlinson W.D. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001; 45(9) : 2658–2661.
 110. Woods DE, Sokol PA, Bryan LE, Storey DG, Mattingly SJ, Vogel HJ, Ceri H. In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis.* 1991; 143-149.
 111. Xu Z, Li L, Shirliff M. E, Alam M. J, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and Characteristics of Class-1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology,* Jan. 2009; 47(1): 230–234.

112. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum β - 57 lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1749-1751.
113. Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öxztürk E, Şahin İ.P. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi. *Ankem Derg.* 2006; 20(3): 152-155.
114. Zarakolu P. Gram-negatif bakterilerin temel mikrobiyolojik özellikleri ve sınıflandırması. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; 9-43.
115. Zarakolu P, Metan G, Gürkan Aydın N, Altun B, Haşçelik G, Akova M. The frequency of PER-1 type extended spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiyol Bul.* 2007; 41(3): 363-367.