

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ *Pseudomonas*
aeruginosa SUŞLARININ METALLO- β -LAKTAMAZ
AKTİVİTESİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLER İLE SAPTANMASI**

Elif BOZÇAL

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş Tarihi: 08/07/2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ataç UZEL

Bornova-İzmir

III

Elif BOZÇAL tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Hastane Enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Metallo- β -Laktamaz (MBL) Aktivitesinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemler İle Saptanması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.07.2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Ataç UZEL

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Sanver EKMEÇİ

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK

.....

ÖZET**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ *Pseudomonas aeruginosa*
SUŞLARININ METALLO- β -LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLER İLE SAPTANMASI**

BOZÇAL, Elif
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Ataç UZEL
Temmuz 2009, 122 sayfa

Pseudomonas aeruginosa klinik mikrobiyolojide en önemli nozokomiyal fırsatçı patojenlerden biridir. *P. aeruginosa* üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, göz enfeksiyonları ve sepsis gibi ciddi hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır ve tedavi süreci için ciddi problemlere neden olan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir. Metallo- β -Laktamazlar (M β L), tüm beta-laktam ajanlara karşı dirençe neden olan enzimlerdir. *P. aeruginosa*'da M β L üretimi beta-laktamlara karşı dirençte hala ana mekanizmadır. Dolayısı ile, M β L'ların klinik mikrobiyolojide tanılanması oldukça önemlidir. Bu çalışmaya Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2006'dan 2008'e kadar izole edilen 80 *P. aeruginosa* suşu dahil edilmiştir. İzolatlar; kan, idrar, balgam, yara, göz ve kulağı içeren çeşitli klinik materyallerden toplanmıştır. Klinik materyaller ayrıca, yoğun bakım ünitesi, cerrahi, ortopedi, yeni doğan ünitesi, nöroloji, üroloji, hemodiyaliz, dahiliye ve intaniyeyi içeren farklı bölümlerden toplanmıştır. E-test ve disk difüzyon metotları ile belirlenen

VI

P. aeruginosa izolatlarının duyarlılıkları üç antibiyotiğe karşı araştırılmıştır. Duyarlılık sonuçları, Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü'ne (CLSI) göre belirlenmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen toplam 80 *P. aeruginosa* suşunun 28'i (%35) imipeneme (IMP) dirençli, 10'u (%12,50) IMP'e orta duyarlı, 27'si (%33,75) Sefeperazon-Sulbaktam'a (SCF) dirençli ve 23'ü (%28,75) Piperasilin-Tazobaktam'a (TZP) dirençlidir. Ayrıca MβL üretici suşlar IMP, TZP ve SCF'ye dirençli bulunmuştur. IMP'e direnç gösteren izolatların 26'sında (%32,50) MβL üretimi belirlenmiştir. *P. aeruginosa* klinik izolatları arasında MβL üretimini izlemek için double disk sinerji metodu kullanılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının 27'sinde (%33,75) MβL üretimi pozitif olarak bulunmuştur. MβL genlerini saptamak için Multipleks PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) metodu kullanılmıştır. IMP'e dirençli ve orta duyarlı toplam 38 *P. aeruginosa* suşu analize alınmıştır. 80 izolat arasından, 8 (%10) *P. aeruginosa* suşunda MβL genleri (bla_{IMP} and bla_{VIM}) PCR ile saptanmıştır. *P.aeruginosa* izolatları arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek amacıyla AP PCR gerçekleştirilmiştir. SPSS (13.00) analizine göre toplam 17 farklı küme belirlenmiştir. Bla_{IMP} ve Bla_{VIM} genlerini taşıyan toplam 8 *P. aeruginosa* izolatına ait amplikonlara dizi analizi yapılmıştır. Amplikonların dizi homolojileri dizi veritabanlarında BLAST analizi ile araştırılmıştır. *P.aeruginosa* sınıf 1 integronu, *E.coli* sınıf 1 integronu, plazmidleri ve transpozonları ile homoloji saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo-β-Laktamaz, Bla_{IMP}, Bla_{VIM}, Antibiyotik duyarlılık, Hastane enfeksiyonları.

ABSTRACT**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC IDENTIFICATION OF THE
METALLO- β -LACTAMASE ACTIVITY IN NOSOCOMIAL*****Pseudomonas aeruginosa* STRAINS****BOZÇAL, Elif****MSc in Biology Department****Supervisor: Doç. Dr. Ataç UZEL****July 2009, 122 pages**

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important nosocomial opportunistic pathogens in the clinical microbiology. *P. aeruginosa* is leading serious nosocomial infections such as urinary system infections, meningitis, eye infections and sepsis and is resistant to many antibiotics causing serious problems for therapeutic process. Metallo- β -Lactamases (M β L) are enzymes which cause resistance to all beta-lactam agents. The production of M β L is still the main mechanisms is resistance to beta-lactams in *P. aeruginosa*. Thereby, identification of M β L is very important in clinical microbiology. A total 80 *P. aeruginosa* strains were isolated from 2006 to 2008 at Tepecik Training and Research Hospital were included in the study. Isolates were collected from various clinical materials including blood, urine, sputum, wound, eye and ear. Clinical materials were also collected from diverse departments including intensive care unit, surgery, orthopaedics, newborn unit, neurology, urology, haemodialysis, internal medicine and infectious diseases. The susceptibility of *P. aeruginosa* isolates investigated against 3 antibiotics and determined by E-Test and disc diffusion methods. Susceptibility results were determined according to

VIII

CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute). A Total Of the 80 *P. aeruginosa* strains included in this study 28 (35%) were resistant to IMP (Imipenem), 10 (12.5%) intermediate to IMP, 27 (33.75%) resistant to SCF (Sefaperazone-Sulbactam) and 23 (28.75%) resistant to TZP (Piperacillin-Tazobactam). M β L producer strains were also found resistant to IMP, TZP and SCF. M β L production was determined in the 26 (32.50%) isolates which were showed to resistance IMP. Double disc synergy method was used to screen M β L production among the *P. aeruginosa* clinical isolates. M β L producion was found as positive in 27 (33.75%) *P. aeruginosa* strains. Multiplex PCR (polymerase chain reaction) method were used for identifying M β L genes. A Total of 38 *P. aeruginosa* strains showed resistance and intermediate resistance to IMP were analyzed. M β L genes (bla_{IMP} and bla_{VIM}) were determined in 8 (10%). *P. aeruginosa* strains among 80 isolates by PCR. To determine the clonal reletedness between the *P. aeruginosa* isolates AP PCR was carried on. A total of 17 different cluster were determined according to the SPSS (13.00) analysis. A total of 8 amplicons belonging to *P. aeruginosa* isolates which carried on bla_{IMP} and bla_{VIM} genes were sequenced. Sequence homology of the amplicons were searched at sequence databeses by BLAST analysis. Homology was determined with *P. aeruginosa* class 1 integron, *E.coli* class 1 integron, plasmids and transposons.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo- β -Lactamase, Bla_{IMP}, Bla_{VIM}, Antimicrobial susceptibility, Nosocomial infections.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyerek bana yol gösteren ve beni her zaman destekleyen değerli hocam sayın **Doç. Dr. Ataç UZEL**'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarından sayın **Uzm. Dr. Neval AĞUŞ**'a ve **Uzm. Dr. Nisel ÖZKALAY**'a teşekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarını ve bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen **Cengiz ÇORBACI**, **Semiha ÇETİNEL AKSOY**, **Arş. Gör. Özlem ABACI**'ya ve Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan ve beni bu günlere getiren **aileme** sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.2. Morfoloji, Biyokimyasal ve Kültür Özellikleri	5
2.3. Epidemiyolojisi.....	6
2.4. Virülens Faktörleri.....	8
2.4.1. Konak Faktörleri.....	9
2.4.2. Bakteriyel Faktörler.....	10
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ’nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları	12
2.6. Laboratuvar Tanısı.....	14
2.7. Patojenez.....	15
2.8. Genel Antibiyotik Direnç Oranları	16
2.9. Spesifik İlaçlar İle Tedavi Sırasında Antibiyotik Direncinin Ortaya Çıkması	20
2.10. Spesifik İlaçlara Karşı İlaç Mekanizmaları	21
2.11. Beta (β)- Laktamazlar	22
2.11.1. Geniş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	24

XIII

2.11.2. Sınıf A Beta (β)-Laktamazlar	25
2.11.3. Sınıf C Beta(β)- Laktamazlar	26
2.11.4. Sınıf D Beta (β)- Laktamazlar	26
2.11.5. Sınıf B Metallo-Beta (β)-Laktamazlar	27
3. MATERYAL VE METOD	40
3.1. Materyal	40
3.1.1. Besiyerleri	40
3.1.2. Kullanılan Çözelti, Tampon ve Boyalar	42
3.1.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar	45
3.1.4. Referans Suş	46
3.2. Metodlar	46
3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatları	46
3.2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması	47
3.2.3. Metallo-Beta (β)-Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanılanması	49
3.2.4. Metallo-Beta (β)-Laktamazların Tanılanmasında Genotipik Analizler	50
4. BULGULAR	58
4.1. İzolatlar	58
4.2. İzolatların İzolasyonu ve Tanılanması	59
4.3. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları	60
4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	61
4.5. Metallo-Beta-Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik Olarak Tanılanması	66
4.5.1. Double Disk Sinerji Testi	66

XIV

4.6. Metallo-Beta(β)-Laktamazların Genotipik Olarak	
Tanılanması	67
4.6.1. DNA İzolasyonu	67
4.6.2. Plazmid DNA İzolasyonu	67
4.6.3. Metallo-Beta (β) - Laktamaz genlerinin Multipleks PCR İle	
Saptanması.....	71
4.6.4. Dizi Analizi	72
4.6.5. İzolatların Tiplendirilmesi (AP PCR).....	78
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	83
KAYNAKLAR DİZİNİ	107
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. A-13 numaralı izolatın gram boyama sonucu.....	60
Şekil 4.2. 5-b numaralı izolatın Pseudomonas Agar'daki görüntüsü.....	60
Şekil 4.3. 22-22 numaralı izolatın Pseudomonas Agar'daki görüntüsü..	61
Şekil 4.4. İmipenem antibiyotiğinin Muller Hinton Agarda oluşturduğu inhibisyon zonu.....	62
Şekil 4.5. Piperasilin-Tazobaktam ve Sefaperazon-Sulbaktam antibiyotiklerinin Muller Hinton Agar'da oluşturduğu inhibisyon zonları.....	63
Şekil 4.6. Piperasilin-Tazobaktam ve Sefaperazon-Sulbaktam antibiyotiklerinin Muller Hinton Agar'da oluşturduğu inhibisyon zonları	63
Şekil 4.7. 12-b numaralı izolatın Double Disk sinerji Testi.....	67
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının plazmid profilleri-1..	68
Şekil 4.9. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının plazmid profilleri-2. .	69
Şekil 4.10. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının plazmid profilleri-3..	70
Şekil 4.11. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının plazmid profilleri-4.	70
Şekil 4.12. Multipleks PCR analizi ile <i>P. aeruginosa</i> suşlarında blaIMP ve blaVIM genlerinin saptanması.	72
Şekil 4.13. A-6 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	73
Şekil 4.14. A-17 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	73
Şekil 4.15. A-12 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	74
Şekil 4.16. 18-18 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	74
Şekil 4.17. 16-16 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	75
Şekil 4.18. 8-B VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	76
Şekil 4.19. 1-H IMPF5 No'lu izolatın BLAST analizi.	77
Şekil 4.20. 3-3 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.....	78
Şekil 4.21. AP- PCR yöntemi ile <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının genotiplendirilmesi-1.	79
Şekil 4.22. AP-PCR yöntemi ile <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının genotiplendirilmesi-2	80
Şekil 4.23. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının kümelenme analiz sonuçları-1..	81
Şekil 4.24. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının kümelenme analiz sonuçları-2..	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Antimikrobiyal direnç yüzdeleri gösterilmektedir.....	18
2.2. β -Laktamazların Ambler ve Bush'a göre sınıflandırılması	23
2.3. IMP-benzeri M β L'ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları.	33
2.4. VIM-benzeri M β L'ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları.	36
3.1 Çeşitli servislerden toplanan materyaller ve dağılımları.	47
4.1. Çalışmaya alınan <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının gönderildiği servislere göre dağılımları	58
4.2. Çalışmaya alınan <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının materyallere göre dağılımları.....	59
4.3. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının servis, materyal, plazmid, double disk sinerji ve antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımları.	64

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli fırsatçı bir patojendir. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda bulunması önemli bir sorundur. Çoklu direnç gösteren izolatların sayısı uygun olmayan antibakteriyel ajanların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan enfeksiyonların tedavisi ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Klinikte en sık karşılaşılan direnç beta-laktamaz enzimleri aracılığı ile olmaktadır. Bu direnç *Pseudomonas* enfeksiyonlarında sık kullanılan ajanlardan olan beta-laktam antibiyotiklerinin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır (Fidan ve ark., 2005). Her türde beta-laktam antibiyotik günümüzde sayıları 350’yi aşan değişik beta-laktamazlardan bir yada daha fazlası tarafından hidrolize uğratarak inaktif hale dönüştürülebilir. Antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki en iyi örneklerden biri yeni beta-laktam antibiyotiklerin geliştirilerek klinik kullanıma sunulması ve yaygın kullanımını takiben bakterilerin bu antibiyotiklere direnç geliştirmeleridir. 1980’li yıllarda klinik kullanıma giren “geniş spektrumlu” sefaloporinlerin özellikle nozokomiyal kökenli gram negatif enfeksiyonlarda yaygın biçimde kullanımı bu antibiyotiklere karşı da bakterilerin etkili enzimler üretmesine yol açmıştır. Direnç gelişen antibiyotikler içerisinde “oksiimino aminotiozil sefalosporinler”

(Sefotaksim, seftriakson ve seftazidim) ve aztreonam başta gelmektedir (Akova, 2004). Bu nedenle yaygın kullanıma bağlı olarak bu enzimlerle oluşan direncin tedavi öncesi rutin laboratuvarlarda belirlenmesi önem taşımaktadır. Beta-laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları, kromozom veya plazmid kontrolünde olmaları özelliğine göre farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır (Fidan ve ark., 2005). Bush tarafından önerilen sınıflandırmaya göre, grup I'de kromozomal beta-laktamaz grubundan indüklenebilir beta-laktamaz; grup II'de plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu beta-laktamaz" ve grup III'de "metallo-beta-laktamazlar" yer almaktadır (Bush et al., 1995). Bunlar arasında metallo-beta-laktamazlar son zamanlarda yayılmaya başlayarak *Pseudomonas* ve diğer gram negatif nozokomiyel patojenlerde geniş spektrumlu beta-laktam direncine neden olmaktadır (Fidan ve ark., 2005). Metallo-beta(β)-laktamaz üreten (M β L) üreten *P. aeruginosa*, nozokomiyel enfeksiyonların en önemli sebebi olarak rapor edilmiştir. M β L genlerinin ortaya çıkışı ve bakteriyel patojenler arasında yaygınlaşması gelecekteki antimikrobiyal tedavi olanakları açısından endişe yaratmaktadır (Varaiya et al., 2008).

Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma bu antimikrobiyal ajanların beta-laktamazlar tarafından hidroliz edilmesidir. Karbapenem grubu antibiyotikler diğer beta-laktam antibiyotiklere göre daha geniş substrat profiline sahip olmaları, çoğu serin beta-laktamazlar tarafından hidroliz olmamaları nedeniyle tedavide tercih edilen ajanlardır. Ancak penisilin ve sefaloporinlerin yanı sıra karbapenemleri de hidroliz edebilen beta-laktamazlar bulunmaktadır. *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* gibi nonfermenter bakterilerde

saptanan metallo-beta-laktamazlar son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de saptanmaya başlanmıştır. Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan, beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktif olmayan ve geniş substrat profiline sahip olan metallo-beta-laktamazları kodlayan genler kromozom veya plazmid üzerinde bulunan integronlar içerisindeki gen kasetlerinde taşınmaktadır. İntegronların plazmid veya transpozon aracılığı ile bakteriden bakteriye taşındığı saptanmıştır. Metallo-beta-laktamaz genlerini taşıyan gen kasetleri sınıf 1 integronda taşınmaktadır. Nonfermenter bakterilerde ve gram negatif basillerde en sık bulunan integronlar sınıf 1 integron olup, metallo-beta-laktamaz genleri dışında aminoglikozit, sulfonamid, antiseptik ve dezenfektanlara direnci kodlayan gen kasetlerini de taşıyabilmektedir.

Japonya'da 1991 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında metallo-beta-laktamaz saptanmış ve ilerleyen yıllarda önceleri Japonya başta olmak üzere Asya ülkelerinde, daha sonra da Avrupa ve Latin Amerika ülkelerinde metallo-beta-laktamaz üreten izolatlar rapor edilmeye başlanmıştır. Ülkemizde metallo-beta-laktamaz ilk kez bir *P. aeruginosa* izolatında saptanmış ve 2004 yılında rapor edilmiştir (Çakar, 2005).

IMP, VIM, SPM ve GIM olmak üzere dört grup metallo-beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. SPM dışında diğer enzimleri kodlayan genlerin integronda taşınması karbapenem direncinin yayılımını kolaylaştırmaktadır. Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla metallo-beta-laktamazların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi gerekmektedir. Ancak halen rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında güvenilirliği onaylanmış ve standardize

edilmiş bir test yoktur (Çakar, 2005). Beta-laktam antibiyotiklerin ve bunların inhibitör kombinasyonlarının çok sık kullanımı, hem var olan direnç mekanizmalarının artması hem de yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkması nedeniyle gittikçe artan tedavi sorununu gündeme getirmektedir. Bunun için her merkezde bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıkları önerilen standart yöntemler ile araştırılmalı ve direnç oranları bölgesel ve ülkesel çapta saptanmalıdır (Yordangil, 1999).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Gram negatif basillerin %10-%15'ini aerob nonfermenter bakteriler oluşturmaktadır. Bu grup içerisinde yer alan *P. aeruginosa*, bitkilerde hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir (Çakar, 2005).

2.2. Morfoloji, Biyokimyasal ve Kültür Özellikleri

Mikroskobik özellikleri değişiklik göstermekle birlikte *P. aeruginosa* yaklaşık olarak 1,5-3 µm uzunluğunda, 0,5-1 µm genişliğinde, gram negatif bir basildir. Bir yada birden fazla polar konumlu kirpiği vardır ve bu nedenle çok hareketlidir (Çelik, 2007).

P. aeruginosa aerob üreme özelliği göstermektedir. Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak biçimde üreme göstermektedir ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigmenti ayırt edilebilir. Laboratuarlarda, Triptik Soy Agar, Koyun Kanlı Agar, Çukulata Agar, Mueller Hinton Agar, Endo ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C 'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasında önemlidir (Çelik, 2007).

P. aeruginosa oksidaz pozitif olması ve glikozu ferment etmemesi ile Enterobacteriaceae'den ayrılır. Laktoz ve sakaroza etkizidir. Katalaz ve L-arginin dihidrolaz oluşturur; indol ve H₂S üretmez. Metil kırmızısı

ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatiftir; potasyum siyanüre dirençlidir (Çelik, 2007).

2.3. Epidemiyolojisi

P. aeruginosa ilk kez 1960'lı yıllarda immün sistemi baskılanmış yanıklı hastalarda ve kistik fibrozisli hastalarda enfeksiyona yol açması nedeniyle önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmiştir. Halen akciğer, kan ve üriner sistem kaynaklı nozokomiyel bakteriyel enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip olabilmesi bu bakterinin önemini daha da arttırmaktadır (Çakar, 2005). *P. aeruginosa* dünya genelinde nozokomiyal enfeksiyonların %10-15'ini oluşturmaktadır (Blanch et al., 1998).

Hastane dışında toprakta, suda ve bitkilerde bulunabilen *P. aeruginosa* sağlıklı insanlarda kolonize olabilmektedir. Distile suda çözünmüş karbondioksiti, sülfürü, demiri ve divalen katyonları karbon ve gerekli besin kaynakları olarak kullanabilmesi, 45-50 C°'de üreyebilmesi bakteriye çevre koşullarında canlılığını sürdürebilme ve çoğalabilme yeteneğini sağlamaktadır. Toplumdan kazanılan enfeksiyonlarda kaynak genellikle nemli ortamlardır. Deri enfeksiyonları, ülseratif, keratit, eksternal otit, tırnak enfeksiyonları, endoftalmit ve endokardit toplumdan kazanılmış enfeksiyonlara örnek olarak verilebilirler. *P. aeruginosa* kolonizasyonu, sağlıklı kişilerin boğazında, nazal mukozada ve deride %7, dışkıda ise % 24 olarak saptanmaktadır (Çakar, 2005).

P. aeruginosa hastane ortamında hastaların aksilla, kulak, perineum gibi nemli bölgelerinde, ayrıca lavabo, tuvalet, duş başı gibi cansız nemli ortamlarda üreyerek kaynak oluşturabilir. Ayrıca su ile temas eden solunum cihazları, temizleme solüsyonları gibi hastane ekipmanlarında da üreyebilmektedir. *P. aeruginosa* doğada ve insanların normal florasında bulunmaktadır. Hastane dışındaki veya hastaneye başvuran sağlıklı kişilerde düşük oranda bulunmaktadır. Deride %0-2, burun mukozasında %0-3,3, boğazda %0-6,6, dışkıda ise %2,6-24 arasındadır. Oysa hastaneye yatan özellikle yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı olan hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal yolunda ve antibiyotik alan hastaların herhangi bir bölgesinde bu oran artabilmektedir (Aşık, 2006). Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans sistemi bünyesinde 1992-1997 yılları arasında yapılan araştırmada, *P. aeruginosa* bakteriyemi olgularının %3'ünden, pnömonilerin %21'inden (en sık izole edilen etken), üriner sistem enfeksiyonlarının %10'undan (en sık izole edilen 4. etken), göz, kulak, burun, boğaz enfeksiyonlarının %13'ünden (en sık izole edilen 3. etken) ve kardiovasküler enfeksiyonların %5'inden izole edilmektedir (Çakar, 2005).

Olson ve ark.; yoğun bakım ünitelerine (ICU) kabul edilen hastalarda *P. aeruginosa* kolonizasyonu oluştuğunu bulmuşlardır. Sürveyans ve klinik kültürlerin kullanılması ile 270 hastanın 100'ünde *P. aeruginosa* kolonizasyonu saptanmışlardır. Bunların sadece %80'i rektal gözetim kültürleri ile saptanmıştır ve sadece %43'ünü boğaz kültürü ile tanımlanmıştır. Yoğun bakım ünitesinde yapılan diğer bir çalışmada, toplam 50 hastanın %60'ı diyabetli hastalardan ve %40'ı

kanser hastalarından olmak üzere *P. aeruginosa* dağılımı belirlenmiştir (Varaiya et al., 2008).

Ülkemizde bildirilen çok merkezli bir çalışmada, yoğun bakım ünitesinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında oran %80'e kadar çıkmaktadır (Ersöz ve ark., 2004). Cerrahi alan enfeksiyonlarında ise en sık izole edilen bakteriler arasında *P. aeruginosa* %5.9'luk bir orana sahiptir (Sesli ve ark., 2006). Hastanede yatan hastalardan en sık izole edilen bakteriler arasında *P. aeruginosa* %11.2'lik bir yüzdeye sahiptir (Pullukçu ve ark.,2006). Anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'de en sık izole edilen mikroorganizmalar %70-85 oranları ile gram negatif bakteriler olmuş ve ilk iki sırada ise *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri yer almıştır (Avcı ve ark., 2007).

2.4. Virülens Faktörleri

P. aeruginosa konak yüzeylere bağlanma yıkımı ve diğer bakteriyel türler ile rekabet etmek için birkaç virülens faktörüne sahiptir. Başlangıç bağlantısı, pili denilen yapısal bileşikler ile olmaktadır. Ekzotoksin A uzama faktörü 2'yi inaktif ederek protein sentezini durduran en önemli virülens faktörlerinden biridir. Tip III sekresyon sistemi akciğer enfeksiyonunda direkt olarak doku zararına neden olmaktadır (Kasloff, 2008).

2.4.1. Konak Faktörleri

Enfeksiyon hastalığı gelişiminde kişinin immün durumu büyük önem taşımaktadır. Bütünlüğü korunan deride enfeksiyon hastalığı meydana gelmezken, yara ve yanık bölgesine yerleşen bakteri bu bölgelerde çoğalarak kana geçebilir. Mukozal bariyer fonksiyonlarının kaybı *P. aeruginosa*'yı önemli bir patojen haline getirmektedir. Gözde korneal mukoza ve epitel yüzeyde meydana gelen fiziksel hasar bakteri için fırsat oluşturmaktadır. Benzer şekilde gastrointestinal sistem ve orofarenks normal florası ile mukus koruyucu bir rol üstlenir. Doğal bağışıklık sisteminin bu önemli öğeleri kanser kemoterapisi, antibiyotik kullanımı, üst solunum yolunda endotrekeal tüp kullanımı gibi nedenler ile hasara uğrayabilir ve bu nedenle doğal bağışıklık sistemi görevini yerine getiremez. Mukozal yüzeylerde ve kanda bulunan kompleman ve kollektinler gibi çözünür faktörler opsonizasyonun meydana gelmesini ve fagositozun meydana gelmesini sağlayarak fagositozun etkisini arttırmaktadır. Bu çözünür faktörlerdeki çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilecek bozukluklar konağı bakteri karşısında zayıf duruma düşürür. Konak savunma mekanizmasında önemli etmenlerden olan IL-1, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-18, TGF- β ve nitrik oksit gibi sitokin, kemokin ve oksijen radikalleri bir taraftan enfeksiyonun üstesinden gelmeye çalışırken diğer taraftan patojenin yokluğuna bağlı olarak enflamasyona yol açar ve doku hasarına neden olabilirler. Doğal olarak bağışıklık sisteminde önemli bir yer tutan mediyatörlerin daha az ortaya çıkmasına neden olan bu faktörler, enfeksiyonu kolaylaştırdığı gibi daha

az enflamasyona neden olarak enfeksiyonun kronikleşmesine yol açabilir (Çakar, 2005).

2.4.2. Bakteriyel Faktörler

Adezinler: *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde 2 adhezin bulunmaktadır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbria, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir. Pili'ye bağlı tutunma immün sistemi baskılanmış hastaların üst solunum yollarının ve hasar görmüş alt solunum yolu epitellerinin kolonizasyonunda önem kazanmaktadır. Enfeksiyon süreci ilk olarak bakterinin pilileri aracılığı ile yanak epiteli yüzeyindeki belirli reseptörleri tanınması ve yapışmasıyla başlamaktadır (Çelik, 2005).

Proteazlar: LasA proteaz, elastaz, alkalın proteaz ve proteaz IV *P. aeruginosa*'da bulunabilen proteaz çeşitleridir. Genel olarak proteazlar hücrelerde sitotoksik etki gösterir ve doku yapılarının degradasyonuna yol açar.

Lipopolisakkarit: *P. aeruginosa* izolatlarında bulunan uzun "O" yan zincirleri komplemanın litik etkisini önlemektedir.

Demir Alımı: Demir seviyesi *P. aeruginosa*'da Krebs siklusu ve oksidatif stres altında canlılığını sürdürebilmesi için gerekli genlerin regülasyonu gibi çeşitli fonksiyonların oluşmasında önem taşımaktadır.

Toksinler: *P. aeruginosa*, farklı fonksiyonlara sahip çeşitli toksinler üretebilmektedir. Ekzotoksin A majör hücrel toksin olup

protein sentezini inhibe ederek lokal ve sistemik patolojide rol alan bir toksindir.

Tip III Sekresyon Sistemi: Ekzoenzim S, Ekzoenzim T, Ekzoenzim U ve Ekzoenzim Y olmak üzere dört proteinden oluşan bu sistem ökaryotik hücrelerde bakteriyel toksinlerin direk enjeksiyonunu sağlamaktadır.

Pigment oluşumu: *P. aeruginosa* kökenlerinin büyük çoğunluğu bir yada daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlanılanları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan turkuaz mavisi renkli piyosyanin pigmentidir. Bu iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmuşsa da diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını arttırmaktadırlar (Çelik, 2007).

Ouorum-Sensing (QS): “Ouorum-sensing”, bakterinin çevresinde bulunan kendi türüne ait populasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir. Bakteri populasyonu belli bir yoğunluğa ulaştığında özel sinyal molakülleri sayesinde bakterinin metabolizmasında bir takım değişikliklere neden olmakta ve bazı genlerin ekspresyonu meydana gelmektedir. *P. aeruginosa*’da şimdiye kadar tanımlanmış iki QS sistemi bulunmaktadır. Bu sistemler *P. aeruginosa*’da virülenstan sorumlu genlerin ekspresyonunda rol oynamaktadır. QS sistemi tarafından regüle edilen virülens faktörleri arasında elastaz, alkelen proteaz, hemolizin, rhamnolipid ve ekzotoksin A sayılabilir. Bu sistem aynı zamanda *P.*

aeruginosa'nın patogenizinde son derece önemli olan biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır.

Biyofilm oluşumu: *P. aeruginosa* özellikle kistik fibrosiz hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşturma özelliğine sahiptir. Biyofilm oluşmu bakterinin katı yüzeye tutunmasıyla başlar. Bu aşamayı takiben bakteri bir taraftan hızla çoğalmaya, diğer taraftan ekzopolisakkaritten itibaren bir kılıf oluşturmaya başlar. Biyofilmi oluşturan bakteriler fenotipik ve metabolik olarak değişime uğradıkları için çevre koşullarına ve antibiyotiklere dirençli hale gelir (Çakar, 2005).

2.5. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları

P. aeruginosa insanlarda çeşitli hastalıklara yol açar. Bu hastalıkların önemli bir özelliği insandan insana bulaşmamalarıdır (Bilgehan,1972). Örneğin kistik fibrosiz (CF), *P. aeruginosa*'nın temel faktörü olduğu otozomal multisistematik bir hastalıktır ve *P. aeruginosa* mikrobiyal ekzopolisakkarit alginatların bol olduğu mukozal yüzeylerde koloniler oluşturmaktadır ve bu alginat , antimikrobiyal ajanlara karşılık polianyonik bir bariyer olarak bulunmaktadır (Spencer et al., 2002). Ayrıca *P. aeruginosa* nedeniyle oluşan hastane kökenli pnömoni (HAP) yüksek mortaliteye sahiptir.

Pseudomonas enfeksiyonlarının meydana gelebilmeleri için bakterilere ait ve virülens ile ilgili faktör dışında insanlara ait faktörler şu şekilde özetlenebilir; vücudun enfeksiyonlara karşı direncin kırılmış

olması, yeni doğan ve özellikle prematüre çocukların *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı açık bir duyarlılıkları olması ve sağlam ve direnci yerinde bulunan vücutta bakterilerin çeşitli yollardan savunma mekanizmasını atlayarak doku içine sokulmalarıdır (Bilgehan, 1972).

P. aeruginosa'nın yaptığı enfeksiyonların en önemlileri şunlardır:

Yara ve Yanık Enfeksiyonları: çeşitli yollarla bulaşan bakteriler lokal ve çoğu kez mavi renk veren enfeksiyonlara yol açmaktadır. Geniş yanıklarda ve yaralarda bakterilerin kana geçerek yayıldıkları ve sepsise yol açtıkları gözlenebilir.

İdrar Yolu Enfeksiyonları: Çoğu kez bulaşma sonda veya sitotoskop gibi aletlerle idrar kesesine sokulan *Pseudomonas* bakterilerinin yaptığı enfeksiyon tipidir. Sistit ve bakterilerin yukarı yollarla ulaşmaları ile piyelit, piyelonefrit tipinde ve tipik klinik tabloda hastalıklar şeklinde görülür.

Menenjitler: Çoğu defa lomber anestezi ya da tanı amacı ile yapılan lomber ponksiyon esnasında bakterilerin kirli iğne veya solüsyonlarla BOS'a verilmesinden sonra oluşan ağır ve pürülan tipte menenjitlerdir.

Göz Enfeksiyonları: Korneada bir ülserasyon olması halinde göze damlatılan kontamine çözeltilerden, göze sıçrayan yabancı cisimlerden gelişen ve bazen körlüğe varacak gözün kaybı ile sonuçlanabilen bir enfeksiyondur. *Pseudomonas*'lar ile kontamine kontakt lens sıvılarının kullanılması ile sağlam gözde bile bu tip enfeksiyonların oluştuğu görülmüştür.

Sepsis: *P. aeruginosa* sepsislerinde ölüm oranı yüksektir. Vücut savunması düşük ve yeni doğan çocuklarda, immünosupressif ilaç alan lösemili, lenfomalı çeşitli lokalizasyonlardan (yara, yanık enfeksiyonları v.b.) kaynak bulurlar. Lökosit sayısı normal veya düşüktür. Hastalık esnasında hemorajik ve nekrotik yaralar şeklinde gelişme gösteren döküntüler görülür. Bunların oluşumu kapiller damarlardaki *Pseudomonas*'ların deriye lokalizasyonu ile olur.

Ayrıca; dış kulak yolu iltihapları, orta kulak iltihapları ve küçük çocuklarda diyareler de *P. aeruginosa*'nın yaptığı enfeksiyonlar arasındadır (Bilgehan, 1972).

2.6. Laboratuar Tanısı

P. aeruginosa izolasyonunda alınacak örnek, enfeksiyonun yerine göre değişmek üzere balgam, idrar, pü, 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 (Varaiya et al., 2008). Koloni morfolojisi, varsa pigment oluşumu ve üzüm benzeri kokusuyla çoğu zaman kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Koloniler genellikle basık, R koloni formundadır. Ancak S koloni veya M koloni formunda koloni varyantları da oluşturabilmektedir. M koloni varyantları genellikle kistik fibrozis hastaların balgam örneklerinde tanımlanmaktadır. Oksisaz pozitif olması, üç şekerli demirli besiyerinde fermentatif etki göstermemesi, 42C°'de üreyebilmesi ve Mueller-Hinton agarda çoğunlukla pigmentin gözlenmesi tanı koydurucu özelliklerdir (Xu et al., 2004). Pigment oluşturmayan *P. aeruginosa* suşları da bulunabilmektedir. Bu suşların

tanımlanması amacıyla glukoz oksidasyonu, asetamit hidrolizi, ve nitratların nitrojen gazına redüksiyonu testleri yapılarak tanı konmaktadır (Ohara et al., 2007). Rutin laboratuvarlarda uygulanan konvansiyonel biyokimyasal testlerin yanında tanımlamada kullanılabilen ticari otomatize sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler tanımlamayı ortalama %90 doğru yapmakta ve sonuçlar 4-48 saatte alınabilmektedir (Çakar, 2005).

2.7. Patojenez

P. aeruginosa patogenezi üç safhaya ayrılabilir: (i) bakteriyel bağlanma ve kolonizasyon , (ii) lokal invazyon ve yayılma ve (iii) hastalık ilerlemesi herhangi bir safhada durmasına rağmen, sistemik hastalığa yol açmasıdır. Organizma, kolonizasyon ve enfeksiyonu arttıran çeşitli virülens faktörleri ile donatılmıştır. Örneğin; pili veya fimbria ve mukoid ekzopolisakkaritler *P. aeruginosa*'nın epitelyum hücrelere yapışmasını sağlamaktadırlar. Ek olarak; bakteriyel hücre yüzeyinde bulunan ekzoenzim S, solunum sistemi epiteline yapışmada aracıdır. *P. aeruginosa* , biyofilm oluşturan bir organizma olarak klasik bir organizmadır. Bu biyofilmler tercih olarak; ölü dokulardaki endotrakeal tüplerde, nekroza uğramış kemik, akciğer dokuları ve kistik fibrozisli hastaların dokularında oluşmaktadır. Bakteriler fagositosizden ekstraselüler polisakkarit matriks içerisine gömülerek korunmaktadırlar. Biyofilm içerisindeki bakteriyel büyüme, antimikrobiyal tedaviye direncin gelişmesinde katkıda bulunmaktadır. Bu artan direnç büyüme oranının, biyofilm içerisine antimikrobiyal penetrasyonun azalmasına neden olmaktadır (Loans et al., 2007).

Kronik bakteriyel enfeksiyonlar genellikle biyofilm oluşumunu içermektedir. Kistik fibrozisli hastalar ile balgamdan izole edilen *P. aeruginosa*, genel olarak ekzopolisakkarit alginat üreten mukoid varyantlarıdır. Bu mukoid varyantların varlığı bakteriyel biyofilmlerin oluşumu ile korelasyon göstermektedir. Spesifik bir regülatör protein olan PvrR, kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa*'da çalışılmıştır ve bu proteinin antibiyotik duyarlılığı ve direnci arasındaki dönüşümün regülasyonunu sağladığı kadar biyofilm oluşumunu da etkilediği gösterilmiştir. Bu kanıt antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumunun birbiri ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Loans et al., 2007).

2.8. Genel Antibiyotik Direnç Oranları

Sepsis, dünya genelinde yoğun bakım hastalarının genel bir ölüm nedeni olarak bilinmektedir. İn-vitro araştırmalar *P. aeruginosa*'nın Amerika'da hastaneye yatan hastalarda mortalite ve morbitide nedeni olarak dominant gram negatif patojen olduğu gösterilmektedir. Yoğun bakım ünitelerindeki patojenleri araştıran Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin, Ulusal nozokomiyel Enfeksiyon Gözetimi Birimi (NNIS), *P. aeruginosa* 'nın ulusal ölçüde gram negatif fırsatçı patojen olarak diğer patojen suşlara göre %7,5'lik bir paya sahip olduğunu bildirmişlerdir. 1986'dan 2003'e kadar her yıl NNIS'nin pnömeni verileri *P. aeruginosa*'nın pnömeni etkeni olarak büyük bir orana sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, analizler genel antibiyotik oranlarının klinik olarak önemli olduğunu göstermektedir (Loans et al.,2007). Amerika'da 1994'den 2000'e kadar 396 yoğun bakım

hastasından 35,790 gram negatif aerob organizmanın antibiyotik duyarlılıkları üzerine geniş ölçüde bir araştırma yapılmıştır. Bu dönem sırasında *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnç oranları beta-laktam ajanlarına göre oldukça sabit kalmıştır ve izolatların seftazidim direnci yaklaşık olarak %15 olarak belirlenmiştir. Bu direnç verileri NNIS araştırmasından diğer yayınlanan ulusal verilere göre karşılaştırılarak, beta-laktam direncine karşılık olarak, fluoroquinolon direncinin hızlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Loans et al., 2007).

Son zamanlardaki araştırmaların birçoğunda, bu direnç artmaya devam etmiştir. Antibiyotik duyarlılık verileri, Yoğun Bakım Ünitesi Gözetim çalışmasından (ISS) 1993'den 2002 yılları arasında toplanmıştır ve ulusal düzeyde *P. aeruginosa*'nın tüm ilaç sınıflarına karşı duyarlılığının azaldığı gözlenmiştir. Dokuz yıllık bir periyot olduğundan, siprofloksasin (15-32%), imipenem (15-23%), tobramisin (9-16%), ve aztreonam (26-32%)'da antimikrobiyal direnci önemli ölçüde artış göstermiştir. Jones et al., daha düşük bir sefepim direncini (%12,4) tanımlanmasına rağmen, siprofloksasin ve imipenem direnç oranları arasında benzerlik olduğunu rapor etmişlerdir (Loans et al., 2007). 2003 yılında NNIS'in araştırmasına göre *P. aeruginosa*'nın geçmiş 5 yıla göre çeşitli antibiyotiklere karşı direnci karşılaştırıldığında, quinolon direncinin %9, imipenem direncinin %15 ve 3. kuşak sefaloporinlerin ise %20 oranında artış gösterdiği bulunmuştur. Bu veri potansiyel olarak beta-laktam direnç stabilitesinin geçmiş yıllara oranla değiştiğini göstermektedir (Loans et al., 2007).

Çizelge 2.1. Antimikrobiyal direnç yüzdeleri gösterilmektedir (Loans et al., 2007).

<i>P. aeruginosa</i> için Antibiyotik duyarlılık oranları, 1994-2000, Yoğun Bakım Ünitesi	
Antimikrobiyal sınıfı	<i>P.aeruginosa</i> (n=8244)
Amikasin	90
Tobramisin	87
Gentamisin	68
İmipenem	83
Siprofloksasin	76
Sefepim	71
Seftazidim	80
Seftriakson	17
Sefotaksim	13
Aztreonam	67
Piperasillin	74
Tikarsillin	43
Ampisillin/Sulbaktam	2
Piperasillin/ Tazobaktam	78
Ticarsillin/ klavulanat	42

P. aeruginosa için daha sonraki tedavi seçeneklerinde, çoklu ilaç direncinde (MDR) bir artış olduğu gözlenmiştir. (antipseudomal ilaçlar için dirençlilik ≥ 3 'tür.) ISS 'nin verilerine göre Amerika'da MDR'nin görülme sıklığının %4'den (1993) %14'e (2002) yükseldiği görülmüştür. Diğer çalışmada, %7,2'den (2001) %9,9'a daha düşük bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmalar potansiyel olarak tek ilacın direnç artış oranını değil, çoklu ilaç direnç oranını da göstermektedir ve bu kritik hastaların ampirik tedavisini önemli ölçüde etkilemektedir (Loans et al., 2007).

Ülkemizde ise Fidan ve ark., 40 *P. aeruginosa* şuşunda %15 siprofloksasin, %18 amikasin, %15 piperasilin/tazobaktam, %23 sefoperozon/sulbaktam, %15 imipenem, %20 meropenem, %15 seftriakson, %23 seftazidim direncini belirlemişlerdir. Ayyıldız ve ark., Siprofloksasin direncini %10, İmipenem ve Amikasin direncini %3 ve seftazidim direncini %15 olarak bildirmişlerdir (Fidan ve ark., 2005). Akur ve ark.'ın çalışmasında meropenem direncinin ise yıllar içinde %21'den %69'a yükseldiği gözlenmiştir (Ersöz ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise *P. aeruginosa* kökenlerinde siprofloksasine direnç oranı %32,6 olarak saptanmıştır (Pullukçu ve ark., 2006). 2000-2002 ve 2003-2005 dönemi karşılaştırıldığında, test edilen tüm antibiyotikler içinde *P. aeruginosa* şuşlarında sefepim, seftazidim, gentamisin, amikasin direncinde düşüş; siprofloksasin direncinde artış gözlenmiştir (Avcı ve ark., 2007).

2.9. Spesifik İlaçlar İle Tedavi Sırasında Antibiyotik Direncinin Ortaya Çıkması

P. aeruginosa'da antibiyotik direnci artan bir problemdir ve başlangıçta duyarlı olan strainler genellikle yüksek sıklıkta tedavi sırasında direnç kazanmaktadırlar. Bu direncin oluşması; beta-laktamları, aminoglikozidleri ve quinolonları içeren tüm ilaç sınıflarında rapor edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın çoğu suşu, geniş spektrumlu beta-laktamları hastalara uygulamadan önce beta-laktam direnci göstermektedirler. Örneğin; tek bir tıp merkezinde 155 *P. aeruginosa* izolatını içeren ve tipik olarak kromozomal AmpC beta-laktamaz üreten bakteriyel suşlarının direnci ile kullanımdan önceki seftriakzon, sefotaksim, seftazidim ve piparasilin arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Manian et al., yoğun bakım ünitesinde başlangıçta 594 ve tekrar olarak da 287 gram negatif izolat arasındaki direnç oranlarını belirlemişlerdir (Loans et al., 2007).

İlginç bir çalışma da *P. aeruginosa* izolatlarının dört farklı antimikrobiyal ajana karşı maruz bırakılması sonucu direncin ortaya çıkmasındaki ilişkiyi göstermiştir. Bu antimikrobiyal ajanlar: seftazidim, siprofloksasin, piperasillin ve imipenemdir. *P. aeruginosa* enfeksiyonuna sahip 271 hastanın sadece % 10'unda antibiyotik direncinin meydana gelmesi gözlenmiştir. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tiplendirmesi de bu dirençli organizmaların başlangıçta duyarlı organizmalardan meydana geldiğini doğrulamıştır. İmipenem direncin oluşmasında en yüksek riski taşımasına rağmen seftazidim en düşük,

siprofloksasin ve piperasillin orta seviyede risk taşımaktadırlar (Loans et al., 2007).

2.10. Spesifik İlaçlara Karşı İlaç Mekanizmaları

P. aeruginosa genellikle çeşitli geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı dirençlidir ve bu durum *P. aeruginosa*'yı güç bir patojen haline getirmektedir. *Pseudomonas*'ın çoklu antimikrobiyal ilaç sınıflarına karşı direnci birçok faktöre dayanmaktadır. Antibiyotikleri içeren çoğu küçük hidrofilik moleküller, hücreye dış membranda bulunan spesifik olmayan porin kanalları aracılığı ile girmektedir. *P. aeruginosa*'nın dış membran geçirgenliğinin *E. coli*'den 10-100 kat daha etkisiz olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın simgesi olan bu yüksek dirençlilik, bu geçirgen olmayan dış membran ile geniş spektrumlu çoklu ilaç effluks sisteminin ekspresyonu arasındaki sinerjinin sonucunda tanımlanmıştır. Bu effluks sistemleri; belli konsantrasyonlarda toksik yapıların hücre içerisine girmesini önleyen fizyolojik bir işleve sahiptir. Genellikle boyaları, deterjanları, organik solventleri ve antibiyotiklerin yanında metabolitleri stoplazmadan veya periplazmik bölgeden uzaklaştırmaktadır (Loans et al., 2007). Özellikle karbapenem direnci; dış membran geçirgenliğinin azalması, artan pompalama sistemleri, penisilin bağlayan protein (PBPs) 'lerin yapısal değişimleri ve karbapenem hidroliz eden enzim-karbapenemaz nedeni ile (Varaiya et al., 2008).

2.11. Beta (β)- Laktamazlar

Beta-laktamazlar, beta-laktam antimikrobiyal ajanlarına karşı oluşan bakteriyel direncin en yaygın sebebidir (Livermore, 1995). β -laktamazlar ilk olarak 1940'ların başlarında, Boston'da büyük ölçüde penisilinler kullanılmaya başlamadan önce tanımlanmıştır (Fisher et al., 2005). β -laktam antibiyotikleri en sık kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Hücre duvarı sentezinde görev alan penisilin bağlayan protein (PBPs)'ler üzerinde etkilidir. Penisilin bir β -laktam antibiyotiktir ve β -laktam antibiyotikleri hala büyük ölçüde kullanılmaktadır ve klinik olarak kullanılan ilaç çeşitliliği gittikçe artmaktadır. PBPs'de oluşan mutasyonlar β -laktam antibiyotikleri için afiniteyi azaltmaktadır (Fluit et al., 2001). Direncin gelişiminin mekanizması plazmid ve kromozom kontrolündeki β -laktamaz üretimidir. Özellikle *Pseudomonas spp.* kromozomal kontrollü indüklenebilir β -laktamaz sentezlemektedir (Ersöz ve ark., 2004).

β -laktamazlar için birkaç sınıflandırma sistemi yayınlanmıştır. β -laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları ve plazmid yada kromozomal olarak kodlanmalarına göre sınıflandırılmışlardır. İlk sınıflandırma 1970 yılında Jack ve Richmond tarafından önerilmiştir. 1973 yılında Richmond ve Sykes tarafından genişletilmiştir ve 15 yıl sonrasında, 1989 yılında Bush tarafından temel bir düzenlemeye alınarak tekrar önerilmiştir. Bush bu sınıflandırmayı β -laktamazların penisilin, oxasillin, karbenisillin, sephaloridin, geniş spektrumlu sefaloporinler ve imipenem gibi substrat seçimine göre yapmıştır. Fenotipik sınıflandırma nokta mutasyonlarının substrat spesifitesini değiştirmesi nedeniyle problemler ile yüz yüze kalmıştır. Dolayısı ile Ambler tarafından

önerilen sınıflandırma tiplerinden biri A-D arası grubu kapsayan nükleotid dizilerine göre sınıflandırılmaktadır (Livermore, 1995). Sınıf A, C ve D enzimleri aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahipken, sınıf B enzimleri aktif bölgelerinde dört çinko atomuna sahiptir. Sınıf A enzimleri benzilpenisiline karşı oldukça aktiftir. Geniş spektrumlu β -laktamazlar da yine bu sınıfa aittir ve bu enzimlerin bazıları karbapenemlere karşı aktif değildir. Sınıf D OXA-tipi enzimleri kapsamaktadır ve bu enzimler oksasillin'i hidroliz etme yeteneğindedir (Fluit et al., 2001). Hem PBPs hem de β -laktamazlar gram-negatif bakterilerde periplazmik boşlukta bulunmaktadırlar. Gram-pozitif organizmalarda ise PBPs, stoplazmik membranın dış yüzeyinde bulunmaktadır ve burada β -laktamazlar ya dışarıya salınırlar ya da stoplazmik membrana bağlı kalırlar.

Çizelge 2.2. β -Laktamazların Ambler ve Bush'a göre sınıflandırılması (Livermore, 1995).

Yapısal Sınıflandırma (Ambler)	Fonksiyonel Sınıflandırma (Bush)	p	C	Aktivite ^β	KF	ZOX	A	IMP	Klavulanat ile İnhibisyon
Serin β -Laktamaz									
A	2a	+++	+	-	+	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	-	++	-	++
	2bc	++	+	+	+	-	-	-	-
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	+
C	I	++	+/-	İnhibitör	+++	+	inhibitör	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	+/-
Belirlenmedi	4c	++	++	++	V	V	-	-	-
Çinko β -Laktamazlar B	3	++	++	++	++	++	-	++	-

P:Penisilin, C:Karbessilin, Oxa:Oksasillin, KF:Sefalotin, ZOX: Seftizoksım,

A: Aztreonam, IMP: İmipenem

2.11.1. Geniş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, mikrobiyolojik olarak oksiimino sefalosporinleri hidrolize edebilen klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Ancak son yıllarda GSBL kategorisinde değerlendirilen bazı enzimlerin tam olarak bu tanıma uymadıkları gözlenmektedir. Çoğu GSBL, enterik gram negatif bakterilerin klasik plazmid kökenli beta-laktamazları olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'den köken alır. Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ila dördünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL'ler oluşur. Enzimin yapısında meydana gelen bu değişiklik, enzim- substrat ilişkisinin sağlandığı aktif bölgede yeni bir modellemeye yol açarak geniş spektrumlu sefalosporinlerin ve aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesini sağlamaktadır.

Yapısal özellikler evolüsyon açısından GSBL'ler 9 farklı sınıf içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır.

GSBL'lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerir ve Ambler'in moleküler sınıflandırmasına göre A sınıfında yer alır. OXA grubu enzimler ise D moleküler sınıfında yer almaktadırlar. Beta-laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre ise GSBL'ler 2be, 2e ve 2d altgruplarına sokulmaktadır.

GSBL'ler oksiimino sefalosporinler ve aztreonamın yanı sıra birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil

penisilinleri de hidrolize uğratırlar. Ancak bu enzimlerin sefamisin grubu sefalosporinlere (Sefoksitin ve sefotetan) karşı etkisi yoktur. Sefamisinlere etkili olamamaları, GSBL'leri AmpC tipi beta laktamazlardan ayıran önemli karakteristik özellikleridir. GSBL'lerin büyük çoğunluğu, özellikle de TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığı ile sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL de mevcuttur (Akova, 2004).

2.11.2. Sınıf A Beta (β)-Laktamazlar

En geniş ve mekanik olarak en iyi şekilde karakterize edilmiş β -laktamaz sınıfıdır. Tarihsel olarak bu β -laktamazlar penisilin hidrolizi dolayısı ile “penisilinazlar” olarak bilinmektedir. Katalitik olarak da yüksek bir aktiviteye sahiptir ve geniş bir substrat aralığına sahiptir. Sınıf A β -laktamazları düşük moleküler ağırlığına sahip olan Sınıf C ile yakından ilişkilidir. Örneğin *E. coli*, *H. influenza* ve *M. tuberculosis* gibi. Sınıf A β -laktamazların üç alt sınıfı bulunmaktadır: TEM/SHV, *P. aeruginosa* PER/OXA/TOHO sepholoporinazları ve CTX-M (NMC-A) karbapenemaz alt sınıflarıdır. 2004 yılında 135 TEM ve 57 SHV β -laktamaz varyantları bilinmekteydi. Birkaç sınıf A varyantları klavulanat ve sulbaktam gibi inhibitörlerin inaktivasyonuna karşı direnmektedir. Ayrıca yeni sınıf A β -laktamazları da son zamanlardaki seftazidim, sefotaksim, monobaktam ve aztreonamlar gibi sephaloporinlere karşı oldukça aktiftirler. Sınıf A 'nın ayrıca üç ayrı ilişkili sınıfı bulunmaktadır. Bunlar: TEM ve SHV-ESB varyantlarıdır. Bu varyantlar genellikle *Pseudomonas* başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* sınıfı

içerisinde yaygındır ve nozokomiyel patojenler arasında sık olarak gözlenmektedir (Fisher et al., 2005).

2.11.3. Sınıf C Beta(β)- Laktamazlar

Sınıf C β -laktamazlar, sınıf A β -laktamazlar ile β -laktam hidrolizi için aktif bölgelerinde asetilasyon ve hidrolitik deasetilasyon mekanizmalarını paylaşmaktadırlar. Sınıf C β -laktamazlar orijin olarak sefaloporinazlar olarak bilinirler çünkü substrat tercihleri sefaloporinlerdir. Genellikle gram negatif bakterilerde bulunurlar ve *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae*'nin dahil olduğu birkaç organizmada kromozomal olarak kodlanmaktadır. Sınıf C β -laktamazların plazmid tarafından kodlama sıklığındaki artış ilk keşfinden 15 yıl sonra gözlenmiştir. Plazmid tarafından kodlanan sınıf C enzimleri *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *C. freundii*, *E. aerogenes* ve *Proteus mirabilis*'de bulunmuştur. Üçüncü kuşak sefaloporinler son 10 yıldır sınıf C β -laktamazlarına karşı kullanılmaktadır. Fakat sınıf C β -laktamazları çoğu üçüncü kuşak sefaloporinleri hidroliz etme yeteneğindedir. Bu enzimler, geniş spektrumlu β -laktamazlar olarak (ESBLs) isimlendirilmektedir. Üçüncü kuşak sefaloporin direncinde aracıdır fakat, merpenem ve imipenem ya da sephamisinlere karşı etkili değildir (Fisher et al., 2005).

2.11.4. Sınıf D Beta (β)- Laktamazlar

Bu β -laktamazlar ilk olarak oxasillaz olarak isimlendirilmiştir. Bu nedenle hala OXA- β -laktamazlar olarak tanımlanmaktadır. Şu anda bilinen 50 sınıf OXA varyantı bulunmaktadır. Sınıf D enzimler büyük ölçüde *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella sp.*, *K.*

pnemoniae ve *Acinetobacter baumannii*'nin de içinde bulunduğu gram negatif patojenlerde bulunmaktadır. Şu anda OXA β -laktamazların kinlik etkisi *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* ile ilişkili olmasına rağmen, bu durum çoğu gram negatif bakterileri de kapsamaktadır (Fisher et al., 2005).

2.11.5. Sınıf B Metallo-Beta (β)-Laktamazlar

Sınıf B olarak isimlendirilen metallo- β -Laktamazlar (M β L), ilk olarak 1967 yılında Kawabata ve Abraham tarafından zararsız gram-pozitif *B. cereus*'un kromozomal enzimi olarak tanımlanmıştır (Fisher et al., 2005). M β L'lar, enzim aktivitesi için kofaktör olarak işlev gören çinko iyonuna sahip β -laktamaz grubuna aittir. Bunlar sadece karbapenemleri güçlü hidrolizleme aktivitesine sahip değil, aynı zamanda β -Laktamlara karşı da aktiviteleri bulunmaktadır (Varaiya et al., 2008). Ancak M β L'lar, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamlar gibi çoğu β -Laktamaz inhibitörleri tarafından hidroliz edilmektedir (Hirakata et al., 2003). Özellikle *P. aeruginosa* olmak üzere gram-negatif bakterilerde M β L'nin ortaya çıkması nozokomiyel enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Transfer edilebilir IMP tipi M β L'ların ilk teşhisi Japonya'da 1980 yılındadır. Dünya genelinde en çok VIM-2 tipi M β L tanımlanmıştır. Aynı zamanda VIM-5 ve IMP-1 Türkiye'de de saptamıştır (Yakupoğulları ve ark., 2007). M β L'lar hızlı bir şekilde Latin Amerika'dan sonra Avrupa'da da yayılmaya başlamıştır. Son zamanlarda M β L'lar Kuzey Amerika'da ve Okyanusya'da da tanımlanmıştır. Dolayısı ile dünya genelinde büyük bir sorun oluşturmaktadır (Zavascki et al., 2006).

MβL'lar neredeyse bütün serin β-Laktamaz inhibitörlerini hidroliz etmektedir. Bunun üç sebebi bulunmaktadır: ilk olarak IMP, VIM ve SMP sınıf genlerinin integronlar tarafından taşınmasıdır. İkincisi ise bu enzim varyantlarının substratlarını hemen değiştirebilmeleridir ve özelliklerini de genellikle tek nokta mutasyonu veya aktif bölgelerini değiştirerek başarmaktadırlar (Fisher et al., 2005).

Son yıllarda MβL genleri *P. aeruginosa*'dan *Enterobacteriaceae* familyasına kadar yayılış göstermiştir. Dolayısı ile gram-negatif bakterilerde geniş spektrumlu antibiyotik direncinin artmasındaki neden, MβL genlerinin birikmesinin sonucudur. Bu genler; tüm β-Laktam sınıflarını hidroliz eden β-Laktamaz inhibitörleri ile nötralize olmayan enzimleri kodlamaktadırlar. MβL genleri genellikle aminoglikozid direnç genleri ile ilişkilidir ve dolayısı ile bakteriler aminoglikozidler ile birlikte direnç gösteren MβL genlerine sahiptir. Bu genler integronlar aracılığı ile taşınan gen kasetlerinde bulunmaktadır. MβL genlerinin yayılması da bla_{VIM-2}'nin yayılımı aracılığı ile gerçekleşmiştir. bla_{VIM-2} şu anda 20 ülkede bulunmaktadır ve 1995 yılında Portekizli bir hastadan orijinlendiği varsayılmaktadır (Walsh et al., 2005).

2.11.5.1. Metallo-Beta (β)-Laktamazların Sınıflandırılması

MBL'lar ilk olarak Ambler tarafından 1980 yılında sınıflandırma şemasının önerilmesiyle serin β-laktamazlardan kategorize edilmiştir. 1989 yılında MβL'ları fonksiyonel özelliklerine göre üç gruba ayırmıştır. Bu sınıflandırma temel olarak substrat profillerine, EDTA'ya karşı duyarlılığına dayanmaktaydı. Bu şema daha sonra 1997 yılında düzenlenmiş ve *Bacteroides fragilis*'den CcrA ve *P. aeruginosa*'dan

IMP-1 gibi izole edilen transfer edilebilir M β L'lar olarak kategorize edilmiştir. Daha sonra bu sınıflandırma şeması imipenem ve diğer β -laktam hidrolizi olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Moleküler seviyede M β L'lar, sekans benzerliğine ve diğer yapısal özelliklerine göre sınıf B enzimleri olarak alt sınıfa ayrılmıştır. M β L'ların üç alt sınıfı bulunmaktadır: sınıf B1, aktif bölgede bir çinko iyonu ile üç histidin, bir sistein kalıntısı içermektedir. Transfer edilebilir M β L'lardan IMP, VIM, GIM ve SPM-1 bu alt sınıf içerisinde bulunmaktadır. Sınıf B2 ise, çinko bağlayan motifin ilk pozisyonunda histidin yerine asparagin içermektedir. *Aeromonas spp.*'den izole edilen NXHDX örnek olarak verilebilir. *Serratia fonticola* 'den izole edilen SFH-1 ve L1 ise B3 sınıfına girmektedir (Walsh et al., 2005).

2.11.5.2. Kromozom Kökenli Metallo-Beta(β)-Laktamazlar

M β L genlerinin birçoğu indüklenebilir ve bu genleri taşıyan bakterilerin büyük çoğunluğu β -laktamlara karşı yüksek oranda direnç kazanmaktadır. *S. maltophilia* ve *B. anthracis* hariç bu bakterilerin çoğu da fırsatçı patojendir. Kromozomal olarak M β L kodlayan bakteriler içerisinde *B. cereus* (BC II), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (L1), *Aeromonas hydrophila* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (Bla veya GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mb11B), *Myroides spp.* (TUS-1, MUS-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *S. fonticola* (SHF-1) bulunmaktadır. *A. hydrophila* ve *A. veronii* bv. *sobia* penisilinaz, sefaloporiyaz ve losporinaz gibi 3 β -laktamaz üretmektedir ve bu

enzimlerin β -laktam dirençli mutantlar seçildiklerinde fazla miktarda ekspresyonu gerçekleşmektedir.

M β L genlerinin bir grubu kromozom kökenli tanımlanmaktadır fakat *Bacteroides spp.*'de diğer anaerobik bakteriler ile karşılaştırıldığında transfer edilebilir genleri bulunmaktadır. *B. fragilis*, β -laktamlara oldukça dirençlidir dolayısı ile CfiA ve CcrA M β L genlerine sahiptir. CfiA M β L geni genetik olarak ilk kez 1990 yılında karakterize edilmiştir ve yapısal fonksiyonel özelliklerine göre çalışılmıştır (Walsh et al., 2005).

2.11.5.3. Transfer Edilebilen Metallo-Beta(β)-Laktamazlarda Genetik Sistemler

Çoğu M β L geni hareketli genetik elementler üzerinde taşınmaktadır. GIM-1 olduğu kadar IMP ve VIM tiplerini kodlayan genler sınıf 1 integronda gen kasetlerinde taşınmaktadır. Aynı zamanda IMP tipi M β L genleri sınıf 3 integronda bulunmaktadır. İntegronlar, iki DNA bölgesi arasındaki bölge-spesifik rekombinasyon aracılığı ile gen kasetlerini sağlamaktadırlar. İntegronlar 3 bölge içermektedirler: 5'korunmuş bölge (5'CS), 3' korunmuş bölge (3'CS) ve değişken bölgedir. 5' bölgesi integras gen (*intl*) içermektedir ve değişken bölgede gen kasetlerinin ekspresyonunu sağlayan rekombinasyon bölgesine (*attI*) ve promotora bitişiktir. 3' bölgesi ise *sul* genine bitişik kısmen silinmiş *gac* geni (*gacEAI*) içermektedir. İntegronlar bir ya da daha fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç geni taşıyabilirler.

2003 yılında M β L geni olan bla_{IMP-13} 'ün integronun İtalya'dan izole edilen bir *P. aeruginosa* izolatında Tn5051 tipi transpozona gömülü

olarak bulunduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak Polonya'dan izole edilen bir *P. aeruginosa* izolatında bulunan bla_{VIM-2} ve bla_{IMP-13} genlerinin aynı bölgede bulundukları saptanmıştır. Sınıf 1 integronun yayılmasından sorumlu olan tnpR transpozonu farklı MβL genlerini üretmektedir (Walsh et al., 2005).

İlk hareketli MβL geni *Bacteroides spp.*'de karakterize edilmiştir. Hitherto ve Japonya IMP tipi MβL'ların özellikle IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-6, IMP-10 ve IMP-11'in temel rezervuarını oluşturmaktadır. VIM tipi MβL 'lar ise ilk defa İtalya'da 1997 yılında *P. aeruginosa*'da saptanmıştır(Walsh et al., 2005).

Brazilya'dan izole edilen *P. aeruginosa* izolatları üzerinde yapılan bir çalışmada DNA'nın upstream bölgesinde ortak bölgeler veya CR elementleri olduğu gösterilmiştir. Integronlar ve transpozonlara karşılık, CR elementleri çok az bilinmektedir. *P. aeruginosa*'daki SMP-1 genlerinin CR elementleri içerdiği bulunmuştur. İlginç bir şekilde bla_{SPM-1} ve ilişkili olduğu genlerin patojenite adalarının bir parçası olduğu ve 180 kb'lık bir plazmid üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Walsh et al., 2005).

2.11.5.4. Transfer Edilebilen Metallo-Beta (β)-Laktamazlar

2.11.5.4.1. İmipenem Benzeri Metallo-β-Laktamazlar

Transfer edilebilen Metallo-β-laktamazlar ilk olarak Japonya'da 1988 yılında bir *P. aeruginosa* straininden keşfedilmiştir. Bu izolatın geniş spektrumlu sefaloporinlere karşı dirençli olduğu kadar imipenem direnç oranı 50 µg/ml'dir. Direnç alleli, diğer *P. aeruginosa* suşlarının yayılmasına neden olan transfer edilebilir konjugatif bir plazmid üzerinde

bulunmuştur. 3 yıl sonra aynı gen Japonya’da üriner sistem enfeksiyonundan izole edilen *Serratia marcescens* suşundan izole edilmiştir. Bu IMP-1 alleli, bir *aac(6')* *Ib*-benzeri gene bitişik olan geniş bir plazmidden izole edilen sınıf 3 integronda bulunmuştur.

Japonya’da 1993 yılında 7 hastane üzerinde yapılan bir çalışmada identifikasyonu yapılan 4 *Serratia marcescens*’in *bla_{IMP-1}* geni taşıdığı gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalar MβL genlerinin gram negatif bakterilerin 16 farklı türünde sınıf 3 integron üzerinde dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (Çizelge 2.3). Çalışmalar ayrıca, MβL pozitif olan *P. putida* suşlarının benzer genotipe sahip olduğunu da göstermiştir.

Shigella flexneri, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* ‘nin MβL genleri varlığı üzerine yapılan çalışmalar sırasında Japonya’da IMP-1’in üç varyantı tanımlanmıştır. Bunlar, IMP-3, IMP-6 ve IMP-10’dur. *S. flexneri*’den izole edilen IMP-3 ‘ün IMP-1’den farkı ise sadece 2 aminoasit değişikliğidir. Aynı aminoasit değişikliği IMP-6’da da gözlenmiştir. Bu aminoasit değişikliği IMP-1’den farklı olarak penisilin G ve piperasiline karşı aktiviteyi azaltır ve yüksek oranda meropenem hidroliz etme aktivitesi kazandırır.

IMP-10, 1995’den 2001’e kadar toplanmış IMP üreten *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* üzerinde yapılan bir çalışma sonucu keşfedilmiştir. *bla_{IMP-10}* geni ise, plazmid ve kromozom aracılı *P. aeruginosa* ve *Achromobacter xylosoxidans* izolatlarında saptanmıştır. *bla_{IMP-10}* geni *bla_{IMP-1}* geninden tek bir baz çifti farkı ile ayrılmaktadır. IMP-tipi MβL genleri daha sonra 1997’de *bla_{IMP-2}* ve 1998’de *bla_{IMP-3}* genleri İtalya’da ve Portekiz’de keşfedilmiştir. Dolayısı ile sadece

Japonya'nın sorunu olmaktan çıkmıştır. IMP-2, IMP-1'e göre otuz altı aminoasit değişikliğine sahipken, IMP-5 de on yedi aminoasit değişikliğine sahiptir.

Çizelge 2.3. IMP-benzeri MβL'ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları (Walsh et al., 2005).

Gen	Bakteri	Ülke	İntegron
IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	sınıf 1,3
		Kore	?
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japonya	sınıf 3
		Singapur	?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya	Sınıf 1,3
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kore	?
		Japonya	sınıf 1
		İngiltere?	?
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singapur	?
		Japonya	sınıf1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japonya	sınıf1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japonya	sınıf 1,3
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Japonya	sınıf 3
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Japonya	?
	<i>Citrobacter freundii</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Japonya	sınıf1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Japonya	?
	<i>Escherichia coli</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Proteus vulgaris</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Providencia rettgeri</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Acinetobacter spp.</i>	İngiltere?	?
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	İtalya	sınıf1
		Japonya	sınıf 1
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	sınıf 1
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japonya	sınıf1

Çizelge 2.3. (devam)

IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	sınıf 1
	<i>Citrobacter freundii</i>	Hong Kong	sınıf 1
		Avustralya	sınıf1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çin	Sınıf 1
		Avustralya	?
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portekiz	sınıf 1
IMP-6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brezilya	?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya	sınıf 1
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kanada	sınıf 1
		Malezya	Sınıf 1
IMP-8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tayvan	sınıf 1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tayvan	sınıf 1
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çin	sınıf 1
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	sınıf 1
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japonya	sınıf 1
IMP-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	?
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japonya	?
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	İtalya	sınıf 1
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	sınıf 1
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brezilya	sınıf 1
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A.B.D.	?

?:İntegron sınıfı saptanamamıştır.

Daha sonraki çalışmalarda diğer IMP varyantları tanımlanmıştır. IMP-12 2000 yılında İtalya'dan izole edilen *P. putida* 'da tanımlanmıştır ve onun alleli bla_{IMP-12} transfer edilemeyen plazmid üzerinde lokalize olmuştur. IMP-1'e göre 36 farklı aminoasite sahiptir ve bu da penisiline karşı düşük aktivite göstermesine neden olmaktadır. Bla_{IMP-13} ise *P. aeruginosa*'dan Roma'da tanımlanmıştır ve kromozomal olarak kodlanmaktadır.

IMP-7 Kanada'da 2 hastanede ortaya çıkan *P. aeruginosa*'da keşfedilmiştir. Integron klonlanmış ve bla_{IMP-7} üçüncü gen kaset pozisyonunda bulunmuştur. Tayvan'da başka bir IMP varyantı olan IMP-8 tanımlanmıştır ve bla_{IMP-8} gen kasetinin sınıf 1 integronda bulunduğu saptanmıştır (Walsh et al., 2005).

2.11.5.4.2. VIM-Benzeri Metallo-Beta (β)-Laktamazlar

M β L'ların ikinci büyük grubu VIM-benzeri enzimlerdir (Çizelge 2.4). VIM-1 ilk olarak İtalya'da bir *P. aeruginosa* izolatından tanımlanmıştır. Bu klinik izolat azteronam hariç piperasillin, seftazidim, imipenem ve aztreonam gibi bir çok β -laktama dirençlidir. bla_{VIM-1} geni ise sınıf 1 integronda bulunmaktadır. Bu integron, bla_{VIM-1} gen kasetine ek olarak integras geni de taşımaktadır. Bu *P. aeruginosa*'nın bla_{VIM-1} integronu muhtemelen kromozom üzerinde lokalize olmuştur. Bla_{VIM-1} geni aynı zamanda *Achromobacter xylosoxidans*'da saptanmıştır. Bu izolat karbapenemleri içeren tüm β -laktamlara karşı direnç göstermektedir. 30 kb'lık konjugatif olmayan sınıf 1 integron taşıyan plazmid üzerinde bulunmaktadır. Bu integron In70, dört gen kaseti ve üç farklı aminoglikozid direnç geni (*aacA4*, *aphA15*, *veaA1*) içermektedir. Ek olarak VIM-1 İtalya'da *P. putida* izolatlarında da saptanmıştır. Bla_{VIM-2} ilk olarak 1996 yılında bir nötrojeni hastasının kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. VIM-2, VIM-1 ile %90 aminoasit benzerliği ile yakın olarak ilişkilidir ve gen kasetleri tarafından kodlanmaktadır. bla_{VIM-2} geni konjugatif olmayan 45 kb'lık plazmid üzerinde lokalize olmuştur. Son zamanlarda VIM-2 ve VIM serisinin varyantı olan VIM-3, Tayvan'da *P. aeruginosa*'da

tanımlanmıştır. VIM-3'ün aminoasit dizisi iki aminoasit değişikliği ile VIM-2'den farklılık göstermektedir. VIM-4, Yunanistan'da bir *P. aeruginosa* izolatından rapor edilmiştir. Bu suş imipenem alan bir hastadan izole edilmiştir azteronam hariç bütün β -laktamlara karşı direnç göstermektedir. VIM-4 VIM-1'den tek bir aminoasit (serin) değişikliği ile farklıdır (Walsh et al., 2005).

Çizelge 2.4. VIM-benzeri M β L'ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları (Walsh et al.,2005).

Gen	Bakteri	Ülke	İntegron
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	+
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	İtalya	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	İtalya	+
	<i>Escherichia coli</i>	Yunanistan	+
	<i>Kelbsiella pneumoniae</i>	Yunanistan	+
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fransa	+
		Yunanistan	+
		İtalya	+
		Japonya	+
		Portekiz	+
		Hırvatistan	+
		Polonya	+
		Arjantin	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kore	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Kore	+
	<i>Serratia Marcescens</i>	Kore	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Kore	?
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Şili	+
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tayvan	?
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japonya	+
	<i>Citrobacter freundii</i>	Tayvan	?
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tayvan	?

Çizelge 2.4. (devam)

VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yunanistan	+
		İsveç	?
		Polonya	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	İtalya	?
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	İtalya	?
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Türkiye	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Türkiye	+
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Singapur	?
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ABD	+
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kolombiya	?
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İngiltere	?
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İngiltere	?
VIM-11a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arjantin	?
VIM11b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	?

?:İntegron sınıfı saptanamamıştır.

VIM benzeri MβL'lar aynı zamanda Türkiye'de de saptanmıştır. Bunlardan biri VIM-1 'den 5 aminoasit değişikliği ile farklı olan VIM-5'dir. VIM-5 *K.pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. VIM-6 Singapur'da *P. aeruginosa*'da rapor edilmiştir. Yine karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'da Teksas'da karakterize edilmiştir. VIM-1 ile %77, VIM-2 ile %74 benzerlik göstermektedir. *Bla_{VIM-7}* geni 24kb'lık plazmid üzerinde lokalize olmuştur (Walsh et al., 2005).

2.11.5.4.3. SPM-1

1997 yılında Brazilya'dan izole edilen bir *P. aeruginosa* SENTRY araştırma programı ile analiz edilmiş ve *blaSPM-1* geni (Sao Paulo MβL) belirlenmiştir. SPM-1'in dizisi diğer MβL 'lar ile karşılaştırıldığında en yüksek benzerlik oranının IMP-1 (%35,5), diğerlerinin ise ImiS (%32,2), CphA (%32,1), BCII (%30,0) ve CcrA'nın (%27,0) olduğu gösterilmiştir.

SPM-1, IMP ve VIM enzimlerinde ayıran özelliği transpozonlar ve integron içerisinde taşınmamasıdır.

SPM-1'in substratları penisilinler, karbensillin, azlosillin ve sephalothin'dir. Genel olarak SPM-1 sefaloporinlere penisilinlerden daha sıkı bağlanmaktadır. IMP-1 ve VIM-1 gibi SPM-1 de klavulanik asit ve aztreonamı hidroliz edememektedir (Walsh et al., 2005).

2.11.5.4.4. GIM-1

Almanya'da bir sağlık merkezinde 4 farklı hastadan izole edilen 5 *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmış ve sınıf B β -laktamaz sınıfına ait GIM-1 ("German imipenemase") enzimi olduğu gösterilmiştir.

GIM-1 enziminin aminoasit dizisi yaklaşık olarak %43.1 ile IMP varyantları olan IMP-6, IMP-1 ve IMP-4 enzimlerine ve %31.2 oranı ile VIM-7 , %28.8 oranı ile VIM-1, VIM-4 ve VIM-5'e ve %28 oranı ile SPM-1 'e benzerdir.

Bla_{GIM-1} geni 45 kb'lık plazmid üzerinde taşınan sınıf bir integronda bulunmuştur. Bu integron aynı zamanda iki aminoglikozid direnç geni ve OXA-2 olan β -laktamaz geni içermektedir (Walsh et al., 2005).

2.11.5.5. Metallo-Beta(β)-Laktamazların Tanısı

M β L'ların klinik mikrobiyoloji'de tanımlanması amacıyla fenotipik testler kullanılmaktadır. M β L varlığını belirlemek için standardize edilmiş herhangi bir fenotipik yöntem bulunmamasına rağmen önerilen bir takım testler bulunmaktadır. Bunların özgüllük ve duyarlılıkları bakteriye ve belirlenecek enzime göre değişiklik göstermektedir. Ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (Aşık, 2006). Uygulanan fenotipik testlerin temeli M β L'ların EDTA ile inhibe olma özelliğine

dayanmaktadır (Bush et al., 1995). Tayin için önerilen testler; EDTA ve ya diğ er enzim inhibitörü şelatörleri ile CAZ veya IMP arasındaki sinerji testleri, Kombine E-Testler ve Modifiye Hodge testi ve mikrodilüsyon testi uygulanabilecek fenotipik testler arasında yer almaktadır ( akar, 2005; Aşık 2006).

M L tanısında genotipik yöntemler de kullanılmaktadır. Genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere göre daha duyarlıdır. Belirli primerler kullanılarak bir izolatta M L geni olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulanarak belirlenebildi i gibi, her enzime özgü primerler kullanılarak enzim tipini saptamak da mümkündür. M L'ların genotipik tayininde daha hassas bir yöntem olan DNA probe'ları da kullanılabilmektedir. Moleküler yöntemlerin altın standardı olarak ise klonlama ve sekans analizi kabul edilmektedir ( akar, 2005).

Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşları arasında, özellikle beta-laktam ve karbapenem grubu antibiyotiklerine karşı dirence neden olan Metallo- -Laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik analizler ile saptanması ve *P. aeruginosa* suşları arasındaki klonal ve epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerleri

Besiyeri olarak, Mueller Hinton Agar (MHA) (Sigma) Pseudomonas Agar (PSA) (Difco), Triptik Soy Broth (TSB) (Difco), Boncuklu saklama besiyeri ve Triptik soy Agar (TSA) (Difco) kullanılmıştır.

3.1.1.1. Pseudomonas Agar

	<u>g/litre</u>
Peptone	20 gr
Mg ₂ Cl	1,4 gr
K ₂ SO ₄	10 gr
Agar	15 gr
pH 7,0 +/- 0,2	

“93661JC no’lu, Difco marka, Pseudomonas Agar” hazır dehidre besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği distile suda çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 15 dk. steril edilmiş ve steril petrilere dökülmüştür. Hazırlanan ortam *Pseudomonas* türlerinin izolasyonunda kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

3.1.1.2. Triptik Soy Broth

	<u>g/litre</u>
Kazein pepton	17,0 gr
Soya pepton	3,0 gr
NaCl	5,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,5 gr
Dekstroz	2,5 gr
pH 7,3 +/- 0,2	

Distile su ile çözülen “Difco” marka, “7043775” no’lu hazır besiyeri otoklavda steril edildikten sonra 45-50°C’ye soğutulmuştur. Petrilere paylaştırılmıştır. DNA izolasyonu 24 saatlik kültür elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

3.1.1.3. Triptik Soy Agar

	<u>g/litre</u>
Kazein pepton	17,0 gr
Soya pepton	3,0 gr
NaCl	5,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,5 gr
Dekstroz	2,5 gr
pH 7,3 +/- 0,2	

Yukarıdaki bileşenlere sahip “Difco” marka “53575D” katalog nolu “Triptik Soy Broth” hazır dehidre besiyerine %1,5 gr oranında agar eklenerek distile suda çözülmüş ve elde edilen Triptic Soy Agar ortamı tüplere paylaştırılmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildikten

sonra eğik bir şekilde soğutularak yatık TSA hazırlanmıştır. Hazırlanan yatık TSA ortamı klinik örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının stok ortamı olarak ve identifikasyon testlerinde de taze kültür hazırlamak için kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

3.1.1.4. Muller Hinton Agar

	<u>g/litre</u>
Beef infüzyon	4,0 gr
Nişasta	1,5 gr
Kazein hidrolizatu	17,5 gr
Agar	15,0 gr
pH 7,4 +/- 0,2	

Yukarıdaki içeriğe sahip “70191, Sigma” marka hazır besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını ölçmek için test ortamı olarak kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

3.1.2. Kullanılan Çözelti, Tampon ve Boyalar

Gram’ın Kristal Violet Boyası

Kristal Violet	2 gr
Etil Alkol (%95’lik)	20 ml
Amonyum oksalat	0,8 gr
Distile su	80 ml

20 ml etil alkolde 2 gr Kristal violet çözülmüştür. 80 ml distile suda da 0,8 gr amonyum oksalat çözüldükten sonra bu çözeltiye alkolde çözülmüş olan kristal violet ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan bu

boya çözeltisi, gram boyama işleminde kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

Gram'ın Safranin Boyası

Safranin	0,25 gr
Etanol	10 ml
Distile su	1000 ml

Safranin etanolde çözüldükten sonra distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek gram boyama işlemlerinde kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

Gram İyodür Çözeltisi

İyot	1,0 gr
Potasyum iyodür	2,0 gr
Distile su	300 ml

İyot ve potasyum iyodür, havanda toz haline getirildikten sonra distile su yavaş yavaş ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elde edilen bu çözelti gram boyama işlemlerinde kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

%95'lik Etanol

Saf Etil alkol	95 ml
Distile su	5 ml

Belirtilen miktarda distile su ile karıştırılarak hazırlanan %95'lik etanol çözeltisi organizmaların gram boyamalarında kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

TE (Tris EDTA) Tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH:8,0)
1mM EDTA (pH:8,0)

STET (pH 8.0): %82 'lik şükroz
%5 triton X-100
5 mM EDTA
50 mM Tris HCl

Lizis Tamponu: 400 mM Tris-HCl (pH:8,0)
60 mM EDTA (pH:8,0)
150 mM NaCl
%1'lik SDS

Potasyum Asetat: 5 M potasyum asetat
11.5 ml glasiyel asetik asit
28,5 ml distile su

Tris-borate- EDTA tamponu (TBE): Stok solüsyon (5x/lt)
54 gr Tris Base
27.5 gr Borik asit
20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8,0)
1X Çalışma solüsyonu:
89 mM Tris base
89 mM borik asit
2 mM EDTA

İzopropanol

Etanol (%70)

EDTA solüsyonu: (0,5 M) pH:8,0
186,1 gr disodium EDTA.2H₂O 1000 ml distile su

dNTP karışımı (Sigma; her deoksinükleotidtrifosfattan 100 mM)

Primerler: M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') (Thermo Fisher Scientific, Germany)

blaVIM F(5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3')

blaVIM R(5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3')

blaIMP F(5'-ATG AGC AAG TTA TCT TAG TAT-3')

blaIMP R(5'-GCT GCA ACG GAC TTG TTA G-3')

MgCl₂ solüsyonu (Fermantas 3 mM)

Tag DNA Polimerazlar (Fermantas 500 U)

Marker DNA'lar (Fermentas, O Gene Ruler 100 bp)

Tag buffer (Fermentas, 10X)

Etidyum Bromür solüsyonu: Stok solüsyon; 10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlanır (Uzel, 2002).

Jel Yükleme Tamponu

% 0,25 Bromfenol mavisi

% 0,25 Ksilen siyanol FF

% 15 Ficoll suda (Tip 400; Pharmacia)

3.1.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar

Mikro santrifüj (14.000g) (Hettich EBA 12R)

Spektrofotometre (Varian 50)

Yatay elektroforez (Consart HU 13)

Güç Kaynağı (1500 V) (Sigma)

Palm Cycler (Corbett Research)

U.V. Transilüminatör (254nm)

3.1.4. Referans Suş

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

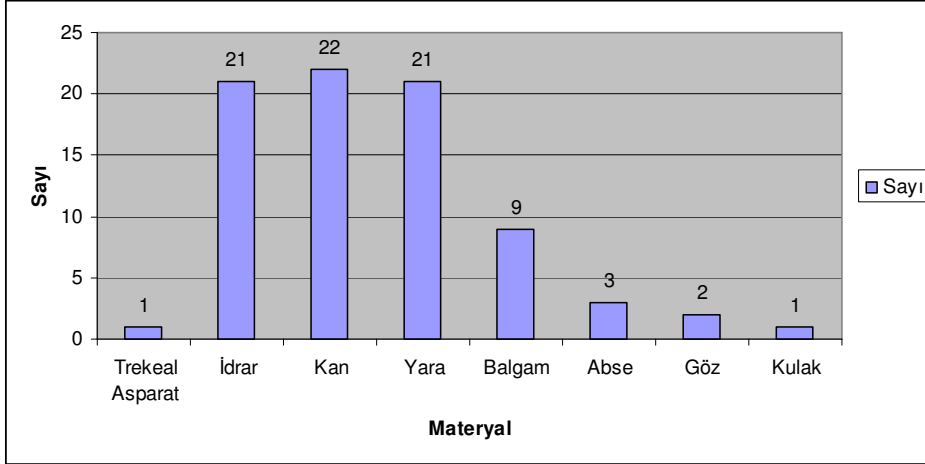
3.2. Metodlar

3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları

Çalışmada Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2006-2008 yılları arasında çeşitli servislerden (İntaniye, Cerrahi, Yoğun Bakım, Ortopedi, Yeni doğan, Nöroloji, Üroloji, Hemodiyaliz) gönderilen 80 adet klinik materyallerden (Çizelge 3.1) izole edilen ve tanılanan 80 *P. aeruginosa* izolatu kullanılmıştır. İzolatların tanınması kültürel ve mikroskopik testler ve VITEC 2 (BioMerieux, France) tam otomatik bakteri identifikasyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Klasik identifikasyon yöntemleri dâhilinde PSA'da mavi-yeşil pigment oluşturan, oksidaz pozitif ve gram boyama sonucunda gram negatif basil olarak gözlenen suşlar *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Boncuklu saklama besiyerinde daha önceden stoklanmış olan *P. aeruginosa* suşları MHA besiyerine ekimleri yapılarak aktiveştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Çeşitli servislerden toplanan materyaller ve dağılımları.



3.2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon ve E Test yöntemleri kullanılmıştır (Goldstein, 2007).

3.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yönteminde 0,02 ml antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda da disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanların çapı ölçülerek “duyarlı”, “orta” ve “dirençli” olacak şekilde duyarlılık kategorileri belirlenir (Gülay, 2002; Kocabeyoğlu, 1990; CLSI).

Çalışmaya alınan 80 izolatın imipeneme karşı direnci disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla antibiyotik duyarlılıkları

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine uygun olarak araştırılmıştır. İncelenecek izolatların Mueller Hinton Agara (MHA)'a ekimleri yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik taze kültürlerden 0,5 McFarland bulanıklılık sağlayacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon steril eküvyon çubuk ile MHA yüzeyine homojen olacak şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra imipenem (10 µg) diski besiyeri üzerine yerleştirildi. 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası inhibisyon zon çapları ölçüldü. Çalışmada kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır (Goldstein, 2007).

3.2.2.2. E Test

Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Gülay, 2002).

Çalışmaya alınan 80 izolatın Beta-laktam veya Beta-laktamaz inhibitörleri grubuna dahil olan Sefoperazon-Sulbaktam (SCF) ve Piperasilin-Tazobaktam (TZP) duyarlılığı E-Test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre araştırılmıştır. Bu amaçla, suşların MHA'a ekimleri yapıldı ve inkübasyon sonucu, kültürlerden 0,5 McFarland bulanıklılık sağlayacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon steril eküvyon ile MHA yüzeyine homojen olacak şekilde yayıldı ve E Test stripleri birbirine paralel olacak şekilde besiyeri yüzeyine yerleştirildi 24

saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MİK değerleri belirlendi (Goldstein, 2007).

3.2.2.3. Sonuçların Yorumlanması

P. aeruginosa için CLSI tarafından bildirilen değerlerine göre yorumlanmıştır.

Çizelge 3.3. CLSI tarafından için bildirilen standart değerler.

Antibiyotik	Duyarlı (µg/ml)	Orta Dirençli (µg/ml)	Dirençli (µg/ml)
Piperasilin- Tazobaktam	≤16	32-64	≥128
Sefoperazon- Sulbaktam	≤16	17-63	≥64
İmipenem	≤ 4	8	≥16

3.2.3. Metallo-Beta (β)-Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanınması

3.2.3.1. Double –Disk Sinerji Testi

Double–Disk sinerji yönteminin temeli EDTA varlığında imipeneme karşı oluşan inhibisyon zonunun genişlemesi mekanizmasına dayanmaktadır (Arakawa et al., 2000). Bu yöntemde İmipenem-EDTA disk metodu kullanılmıştır. MHA besiyerine McFarland 0,5’e göre ayarlanmış test edilecek *P. aeruginosa* suşu ekilmiştir. 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 186,1 disodium EDTA.2H₂O 1000 ml distile

suda çözülmüş ve pH:8,0'a ayarlanmıştır. 2 adet 10 µg imipenem diski yaklaşık olarak birbirinden 10 mm uzaklıkta koyulmuştur. Disklerin biri üzerine 10 µl 0,5 M EDTA solüsyonu eklenmiş ve plak 24 saat 37°C'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası küçük bir sinerjistik inhibisyon zonunun bile bulunması metallo-β-laktamaz varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Young, 2002).

3.2.4. Metallo-Beta (β)-Laktamazların Tanılanmasında Genotipik Analizler

3.2.4.1. DNA İzolasyonu

AP PCR tiplendirmesinde ve metallo-β-Laktamazların genotipik tanımlanmasında kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu Liu et al.,'a göre yapılmıştır.

- 1) Triptik Soy Broth kültürden 24 saatlik 0,5 ml organizma ependorf tüpüne alınır ve 12000 rpm 'de 6 dakika santrifüjlenir.
- 2) Süpernatant atılır.
- 3) Pelletin üzerine 2 mg /ml lizozim eklenir
- 4) Pellet üzerine 500 µl lizis buffer ilave edilir.
- 5) Karıştırılır
- 6) 150 µl potasyum asetat ilave edilir.
- 7) Karıştırılır.
- 8) 10000 rpm'den daha yüksek hızda 1 dakika santrifüjlenir
- 9) Süpernatant yeni bir tüpe alınır.
- 10) Eşit hacimde isopropil alkol ilave edilir.
- 11) Tüp karıştırılır.

- 12) >10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir
- 13) Süpernatant atılır.
- 14) Pelletin üzerine 300µl %70’lik etanol ilave edilir.
- 15) 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
- 16) Etanol uçurulur.
- 17) 50 µl saf suda çözündürülür ve +4°C’de saklanır (Liu et al., 2000).

3.2.4.2. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid profilleri ile *P. aeruginosa* suşları arasındaki direnç profillerinin karşılaştırılması amacıyla plazmid DNA izolasyonu için ”kaynatma” metodu kullanılmıştır .

- 1) 5 ml steril Triptik Soy Broth ortamına *P. aeruginosa* suşları inoküle edilir. Bir gece 37°C’de inkübasyon gerçekleştirilir.
- 2) Hücrelerin 1,5 ml’si steril Ependorf tüpüne alınır,santrifüjlenir (7000/10 dk) ve süpernatant atılır.
- 3) Elde edilen hücre pelleti 1ml TE tamponunda süspanse edilir ve 2 kez yıkanır.
- 4) Hücre pelleti üzerine 300µl STET solüsyonu eklenir, vorteks ile karıştırılır ve 37°C ‘de 10 dakika bekletilir.
- 5) Arkasından ependorf tüpleri 1-2 dakika buzda bekletilir ve 100 °C ‘lık su banyosunda 60 saniye tutulur.
- 6) Süspansiyon 15000 devir/dakika ‘da 15 dakika santrifüjlenir.
- 7) Süpernatant başka bir ependorf tübüne aktarılır.
- 8) 2 hacim soğuk etanol ilave edilir ve -20°C’de 2 saat bekletilir.
- 9) 15000 devir/dakika 20 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.

- 10) Çökelti kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilir. Etanol uçurulduktan sonra 50 µl ultra saf suda plazmid süspanse edilir. (Macneil, 1986).

3.2.4.3. AP PCR

İdentifikasyonu yapılmış 80 *P. aeruginosa* izolatının genotipik benzerliklerini değerlendirmek amacıyla AP PCR yöntemi uygulandı. Bu yöntemde M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanıldı. PCR toplam 25 µl hacimde gerçekleştirildi.

Tepkime karışımı içeriği:

- 1X PCR tamponu
- 0,2 mM dNTP karışımı
- 2,5 mM MgCl₂ karışımı
- 0,50 U Tag polimeraz
- 30 pmol M13 primeri
- 2µl Kalıp DNA

Elde edilen PCR karışımı “Palm Cycler” cihazına koyularak aşağıdaki program uygulandı:

1. 94°C’de 4 dakika
2. 30 °C’de 1 dakika
3. 72°C’de 1 dakika (1, 2 ve 3 nolu aşamalar araka arkaya 2 döngü)
4. 94°C’de 30 dakika
5. 55°C’de 30 saniye
6. 72°C’de 1 dakika (4, 5 ve 6 nolu aşamalar arka arkaya 44 döngü)
7. 72°C’de 4 dakika

Her PCR denemesinde DNA kalıbı haricinde (onun yerine steril distile su konulur) bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon körü (negatif kontrol) de kullanılmıştır (Uzel, 2002; Çakar, 2005).

3.2.4.4. DNA'nın Elektrofözezi

Genomik DNA bütönlüğü ve plazmid DNA profillerinin kontrolü için elektrofözeze kullanılmıştır.

Agaröz jel elektrofözezi, 5µg/ml etidyum bromid'li %1 agaröz (Sigma) içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektrofözeze TBE tamponu kullanılmış, 5µl DNA solüsyonu, 2µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 120V'da 45 dakika süreyle yürütölmüştür. Elektrofözeze sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütönlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Çetinel Aksoy, 2008).

3.2.4.5. Plazmid DNA'sının elektrofözezi

Plazmid DNA'nın elektrofözezi 3.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.6. AP PCR Ürünlerinin Elektrofözezi

PCR ürünlerinin elektrofözezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Aynı ya da farklı agaröz jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi için elektrofözeze koşulları standardize edilmiş ve bütün elektrofözeze işlemleri aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elektrofözeze, 120V'da 1,5 saat boyunca sürdürölmüş, Orange G başlangıç noktasından 8cm uzaklığa ulaşınca sonlandırılmıştır. Tampon olarak TBE kullanılmış ve elektrofözeze %1'lik agaröz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken

içerisine, 10 mg/ml’lik Etidyum bromür solüsyonundan son konsantrasyon 0,5µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir (Çetinel Aksoy, 2008).

Elektroforez için 9µl PCR ürünü ve 1,5 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklerle beraber DNA markerı da (O Gene Ruler 100bp DNA) jelde yürütülmüştür.

PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Elektroforez cihazının tepsisi iyice temizlenerek açık uçları bir otoklav bandı ile kapatılır.
2. Cihazın tankları TBE ile uygun seviyeye kadar doldurulur.
3. 250ml’lik temiz bir erlen içerisine 100 ml TBE konulur ve 1,0g agaroz TBE’ de süspanse edilir.
4. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşınca kadar mikrodalga fırında ısıtılarak, agarozun erimesi sağlanır.
5. Solüsyon 60°C’a kadar soğutulur ve 10 mg/ml’lik stok Etidyum bromür solüsyonundan son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde solüsyona ilave edilir.
6. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek yükseklikleri 0,5-1mm olacak şekilde ayarlanır.
7. 60°C’a soğutulan agaroz solüsyonu jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde tepsiye dökülür.

8. Jel oda sıcaklığında tamamen donduktan sonra (60-90 dakika) bantlar ve taraklar dikkatlice çıkarılır.
9. Tanka jelin yüzeyini yaklaşık 1mm kaplayacak şekilde TBE ilave edilir.
10. PCR ürünleri ve Marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılır.
11. Orange G başlangıç noktasından 8cm uzaklaşınca (yaklaşık 1,5 saat) elektroforez sonlandırılır.

UV translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek poloroid bir kamerayla jelin fotoğrafı çekilir.

3.2.4.7. Metallo-Beta- Laktamaz Genlerinin Multipleks PCR İle Saptanması

Çalışmada imipenem dirençli ve orta duyarlı 38 *P. aeruginosa* izolatu Multipleks PCR analizi ile bla_{VIM} ve bla_{IMP} genleri açısından incelenmiştir.

Bla_{IMP} için primer seti; bla_{IMP} F (5'-ATG AGC AAG TTA TCT TAG TAT TC-3') ve bla_{IMP} R (5'-GCT GCA ACG GAC TTG TTA G-3') primerleri kapsamakta ve 765 bp ürün elde edilmesini sağlamaktadır. Bla_{VIM} geni için primer seti; bla_{VIM} F (5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3') ve bla_{VIM} R (5'- ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3') primerlerini kapsamakta ve 261 bp ürün elde edilmesini sağlamaktadır.

PCR toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir.

Tepkime karışım içeriği:

Steril distile su

1XPCR tamponu
 0,2 mM dNTP karışımı
 2,5 mM MgCl₂
 0,250 U Tag Polimeraz
 10 pmol blaVIM/blaIMP F primer, 10 pmol blaVIM/blaIMP R primer
 2,5 µl kalıp DNA
 Otomatik “Palmcycler”a konulan tüpler;
 94°C’da
 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü,
 94 °C’da 25 saniye denatürasyon
 57 °C’da 40 saniye primer birleşmesi
 72°C’da 50 saniye polimerizasyon olmak üzere 30 döngü uygulanmıştır. Son olarak 72 °C’de 6 dakika polimerizasyon süresi eklenmiştir (Çakar, 2005).

3.2.4.8. Multipleks PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Multipleks PCR ürünlerinin’nin elektroforezi 3.2.4.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.9. Dizi Analizi

Multipleks PCR analizi ile bla_{IMP} ve bla_{VIM} geni olduğu saptanan 8 izolata ait 261 bp ve 765 bp’lik amplikonlar, Ankara ODTÜ/ Teknokent’de (REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.) dizi analizine alınmıştır.

Multipleks PCR amplikonları Nucleospin Extract Kit (Takara Inc.) ile temizlenmiş ve ABI 3100 otomatik bir sekans cihazında çift

yönlü olarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi döngü koşulları; 40-60 ng kalıp DNA, 3,2 pmol primer, 4 µl Big Boyası (Applied Biosystems) ve 20 µl su içermektedir. DNA dizi analizi, Multipleks PCR sırasında kullandığımız bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerine spesifik primerler (bla_{IMP} F 5'-ATG AGC AAG TTA TCT TAG TAT TC-3' ve bla_{IMP} R 5'-GCT GCA ACG GAC TTG TTA G-3' ve bla_{VIM} F 5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' ve bla_{VIM} R 5'- ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3') ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi dosyaları Abi formatından Fasta formatına, ChromasPro v1.22 (Technelysium Pty Ltd)'i kullanarak dönüştürülmüştür. Fasta formatı ile elde edilen nükleotid dizilerinin homoloji analizleri ise, NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi), EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)/GenBank (Gen Bankası) ve DDBJ (DNA Japonya Veri Bankası) veri tabanında yapılmıştır. Veri tabanı homoloji araştırmaları sırasında kullanılan nükleotid giriş numaraları: AF318077 (Gibb et al., 2002), AY152821 ve AJ585042 (Patzer et al., 2004), AY033653 (Xiong et al., 2006), Y18050 (Lauretti et al., 1999), AY168635, AY625685, AY625686, AY625687, AY625688 ve AY625689 (Koh et al., 2006).

4. BULGULAR

4.1. İzolatlar

2006-2008 yılları arasında Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastane'sinin çeşitli servislerden (Çizelge 4.1) (Büyük İntaniye, Cerrahi, Yoğun Bakım, Ortopedi, Yeni doğan, Nöroloji, Üroloji, Hemodiyaliz, Çocuk İntaniye) gönderilen materyallerden (Çizelge 4.2.) izolasyonu ve identifikasyonu yapılan 80 *P. aeruginosa* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarının gönderildiği servislere göre dağılımları

Servis	Sayı	%
Cerrahi	16	20,00
Hemodiyaliz	3	3,75
Büyük İntaniye	6	7,50
Yoğun Bakım	33	41,25
Üroloji	6	7,50
Dahiliye	5	6,25
Yeni Doğan	5	6,25
Nöroloji	2	2,50
Çocuk İntaniye	2	2,50
Ortopedi	2	2,50
Toplam	80	100,00

Çizelge. 4.2. Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarının materyallere göre dağılımları

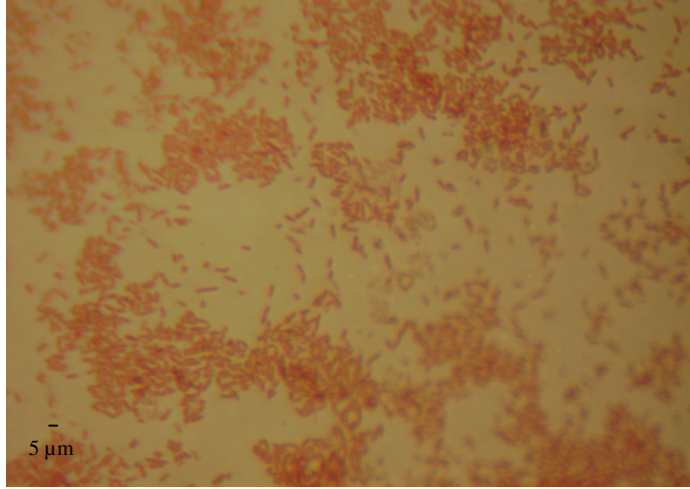
Materyal	Sayı	%
Trekeal Asparat	1	1,25
İdrar	21	26,25
Kan	22	27,50
Yara	21	26,25
Balgam	9	11,25
Abse	3	3,75
Göz	2	2,50
Kulak	1	1,25

4.2. İzolatların İzolasyonu ve Tanılanması

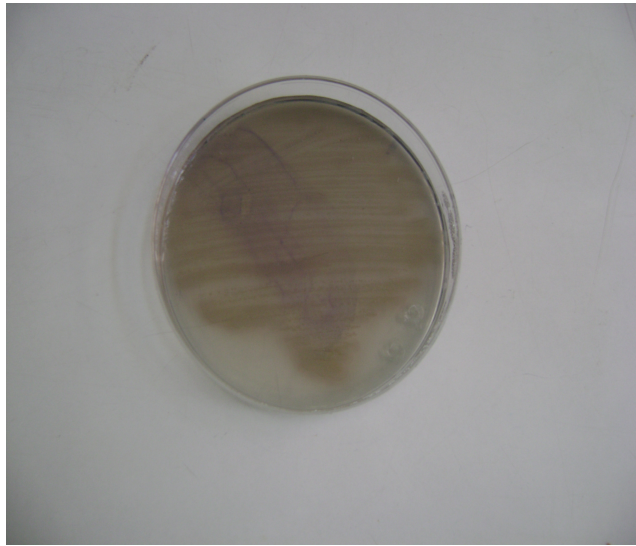
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli materyallerin (Çizelge 4.2.), steril eküvyon çubuk ile PSA'a ekimleri yapıldı ve 24 saat, 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonucu PSA'da pigment oluşumuna ve mukoid koloni morfolojisine göre materyallerden, şuşların izolasyonu gerçekleştirildi.

P. aeruginosa izolatlarının tanılanmasında ise VITEC2 (Biomerieux, France) tam otomatize sistem ve klasik identifikasyon yöntemlerini kapsayan gram boyama, oksidaz testi ve pigment üretme analizleri yapılmıştır. Gram boyama sonucu gram negatif reaksiyon veren, oksidaz testi pozitif ve mavi-yeşil pigment üreten mikroorganizmalar *P. aeruginosa* olarak tanılanmıştır.

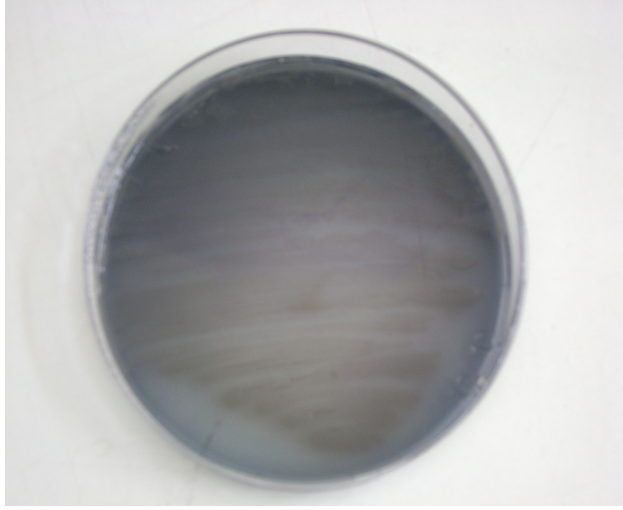
4.3. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları



Şekil 4.1. A-13 numaralı izolatın gram boyama sonucu



Şekil 4.2. 5-b numaralı izolatın Pseudomonas Agar'daki görüntüsü



Şekil 4.3. 22-22 numaralı izolatın Pseudomonas Agar'daki görüntüsü

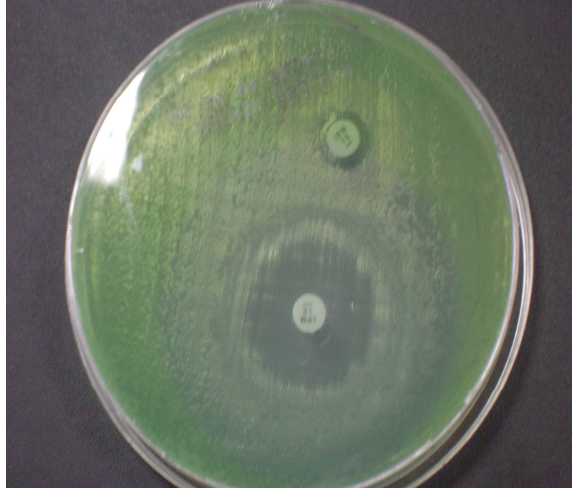
4.4. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik

Duyarlılık Test Sonuçları

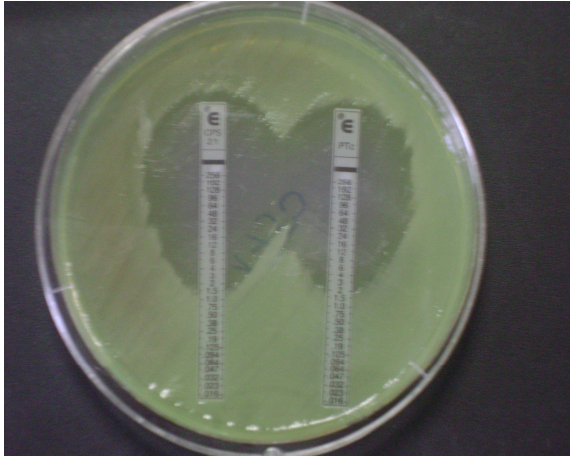
Çalışmaya alınan 80 *P. aeruginosa* izolatına ait antibiyotik duyarlılık testleri CLSI tarafından bildirilen verilere göre disk Difüzyon ve E-Test yöntemlerine göre gerçekleştirilmiştir. İmipenem (IMP), Piperasilin-Tazobaktam (TZP) ve Sefaperazon-sulbaktam (SCF) olmak üzere toplam üç antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri saptanmıştır. IMP duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile; TZP ve SCF duyarlılıkları ise E-Test yöntemi ile saptanmıştır.

80 *P.aeruginosa* izolatının imipenem duyarlılıkları CLSI verilerine göre inhibisyon zon çapı ≥ 16 mm dirençli, 8 mm orta dirençli, ≤ 4 mm ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile imipenem duyarlılıklarının materyallere ve servislere göre dağılımı çizelge 4.3'te gösterilmektedir. 80 *P.aeruginosa*

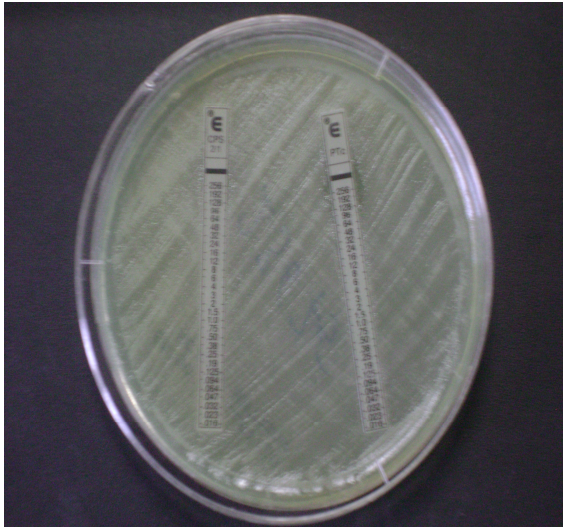
izolatının Sefaperazon-Sulbaktam (SCF) duyarlılıkları CLSI verilerine göre zon çapı ≥ 64 mm dirençli, 17-63 mm orta dirençli, ≤ 16 ise duyarlı olarak kabul edilmiştir. Piperasilin- Tazobaktam (TZP) duyarlılıkları ise CLSI verilerine göre zon çapı ≥ 128 mm dirençli, 32-64 mm orta dirençli, ≤ 16 ise duyarlıdır. *P. aeruginosa* izolatlarının E-Test Yöntemi ile Sefaperazon-Sulbaktam ve Piperasilin-Tazobaktam duyarlılıklarının materyallere ve servislere göre dağılımı Çizelge 4.3’de verilmektedir.



Şekil 4.4. İmipenem antibiyotiğinin Muller Hinton Agarda oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.5. Piperasilin-Tazobaktam ve Sefaperazon-Sulbaktam antibiyotiklerinin Muller Hinton Agar'da oluşturduğu inhibisyon zonları. (S:Duyarlı).



Şekil 4.6. Piperasilin-Tazobaktam ve Sefaperazon-Sulbaktam antibiyotiklerinin Muller Hinton Agar'da oluşturduğu inhibisyon zonları (R: Dirençli).

Çizelge. 4.3. *P. aeruginosa* izolatlarının servis, materyal, plazmid, double disk sinerji ve antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımları.

İzolat Numarası	Double Disk Sinerji	IMP (Disk Difüzyon)	SCF ETest	TZP ETest	Plazmid	Servis	Materyal
18-18	+	R	R	R	+	Çocuk İntaniye	Yara
19-19	+	I	R	I	+	Cerrahi	Yara
10-b	+	R	R	R	-	Cerrahi	Yara
A-13	-	R	S	S	+	Büyük İntaniye	Kan
4-4	-	R	S	S	+	Yoğun Bakım	Yara
12-12	-	R	S	S	+	Ortopedi	İdrar
A-24	-	R	S	S	-	Yoğun Bakım	Balgam
A-20	+	I	R	I	-	Yoğun Bakım	Abse
A-12	+	I	R	R	+	Yoğun Bakım	Kan
A-6	+	I	R	I	+	Yeni Doğan	Göz
21-21	-	R	S	S	+	Dahiliye	İdrar
A-22	-	S	S	S	+	Yeni Doğan	Kan
22-22	+	I	R	R	+	Yeni Doğan	Trekeal asparat
10-10	+	I	R	R	+	Büyük İntaniye	Yara
13-b	+	I	R	R	+	Yoğun Bakım	Yara
A-17	+	I	S	S	+	Cerrahi	Yara
A-7	-	R	I	I	+	Yeni Doğan	Yara
A-1	-	R	S	S	+	Nöroloji	Yara
A-11	-	I	R	R	+	Nöroloji	İdrar
7-7	-	S	S	I	-	Yoğun Bakım	Balgam
13-13	-	R	S	S	+	Yoğun Bakım	Kan
5-b	+	R	I	S	+	Yoğun Bakım	Kan
1-Ş	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Kan
1-P	-	S	S	S	+	Çocuk İntaniye	Kan
2-2	-	S	S	S	+	Cerrahi	Kan
1-L	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Abse
14-b	+	R	R	R	+	Yoğun Bakım	Balgam
1-U	-	S	S	S	+	Ortopedi	Kulak
1-D	-	S	S	S	+	Üroloji	İdrar

Çizelge. 4.3. (devam)

İzolat Numarası:	Double Disk Sinerji	IMP (Disk Difüzyon)	SCF (E-Test)	TZP (E-Test)	Plazmid	Servis	Materyal
1-I	-	S	S	S	+	Cerrahi	Yara
1-Z	-	S	S	S	+	Hemodiyaliz	İdrar
1-X	-	S	S	S	+	Büyük İntaniye	İdrar
A-15	+	R	R	R	-	Büyük İntaniye	Kan
14-14	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar
16-16	+	R	R	R	+	Yoğun Bakım	Kan
1-M	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Yara
1-H	+	R	S	S	+	Yoğun Bakım	Yara
5-5	-	S	R	R	+	Cerrahi	Kan
A-9	+	R	S	S	+	Üroloji	İdrar
1-G	-	S	S	S	+	Üroloji	İdrar
1-E	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar
1-Q	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Yara
1-F	-	S	R	I	+	Dahiliye	Balgam
1-J	-	S	S	S	+	Dahiliye	İdrar
1-W	-	S	S	S	+	Dahiliye	Yara
A-4	+	R	R	R	+	Dahiliye	Yara
2-b	-	S	S	S	+	Hemodiyaliz	Yara
A-19	-	S	S	S	+	Yeni Doğan	Balgam
1-N	-	S	S	S	+	Cerrahi	Kan
9-9	-	S	R	R	+	Yoğun Bakım	Kan
11-11	+	R	S	S	-	Yoğun Bakım	Yara
1-C	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar
1-V	-	S	S	S	+	Büyük İntaniye	Kan
1-R	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar
4-b	-	S	S	S	+	Cerrahi	Yara
6-6	-	S	S	S	+	Üroloji	İdrar
8-b	+	R	R	R	+	Cerrahi	İdrar
A-14	+	R	R	R	+	Yoğun Bakım	Balgam

Çizelge: 4.3. (devam)

İzolat Numarası	Double Disk Sinerji	IMP (Disk Difüzyon)	SCF (E-Test)	TZP (E-Test)	Plazmid	Servis	Materyal
17-17	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Kan
15-15	-	R	R	R	-	Cerrahi	Kan
8-8	-	S	R	R	+	Yoğun Bakım	Kan
A-5	-	S	S	S	+	Cerrahi	Yara
1-b	-	S	R	R	+	Cerrahi	Abse
7-b	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar
A-18	-	S	S	S	+	Büyük İntaniye	Kan
12-b	+	S	R	R	+	Üroloji	Göz
3-3	+	R	S	S	+	Cerrahi	Kan
16-b	-	R	S	S	-	Üroloji	İdrar
A-16	-	I	R	R	+	Cerrahi	Kan
A-21	-	S	S	S	+	Hemodiyaliz	İdrar
1-S	-	S	R	I	+	Yoğun Bakım	Yara
A-10	+	R	S	S	+	Cerrahi	Yara
1-K	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Kan
3-b	+	R	R	R	+	Yoğun Bakım	Balgam
11-b	+	R	S	S	-	Yoğun Bakım	Balgam
15-b	+	R	S	S	+	Yoğun Bakım	Balgam
1-b	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	Kan
9-b	+	R	R	R	+	Cerrahi	İdrar
1-T	-	S	R	R	+	Yoğun Bakım	İdrar
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	S	S	S	+	Yoğun Bakım	İdrar

IMP:İmipenem,SCF:Sefaperazon-Sulbaktam,TZP:Piperasilin-Tazobaktam

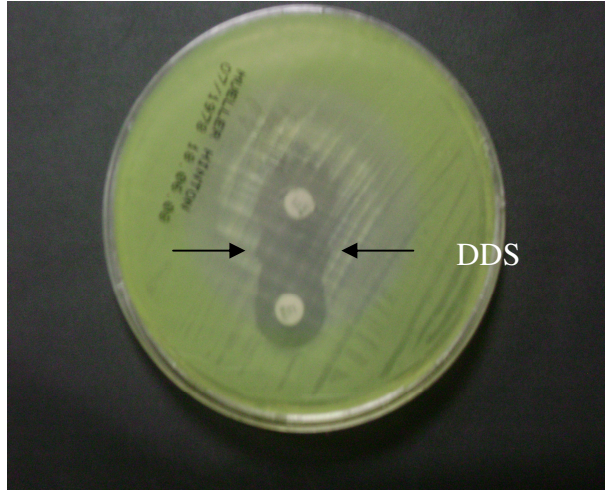
R:dirençli ,I:Orta Dirençli, S: Duyarlı

4.5. Metallo-Beta-Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik Olarak Tanılanması

4.5.1. Double Disk Sinerji Testi

Double disk sinerji testi (DDS) ile 80 *P.aeruginosa* izolatının 27'sinde (% 33,75) MβL fenotipik olarak pozitif bulunmuştur. Double disk sinerji testi ile pozitif ve negatif bulunan izolatların servis ve materyallere göre dağılımı çizelge 4.3'de gösterilmektedir. Kontrol suşu

olarak kullandığımız *P. aeruginosa* ATTC 27853'ün fenotipik olarak M β L aktivitesi negatif olarak saptanmıştır.



Şekil 4.7. 12-b numaralı izolatın Double Disk sinerji Testi

4.6. Metallo-Beta(β)-Laktamazların Genotipik Olarak Tanılanması

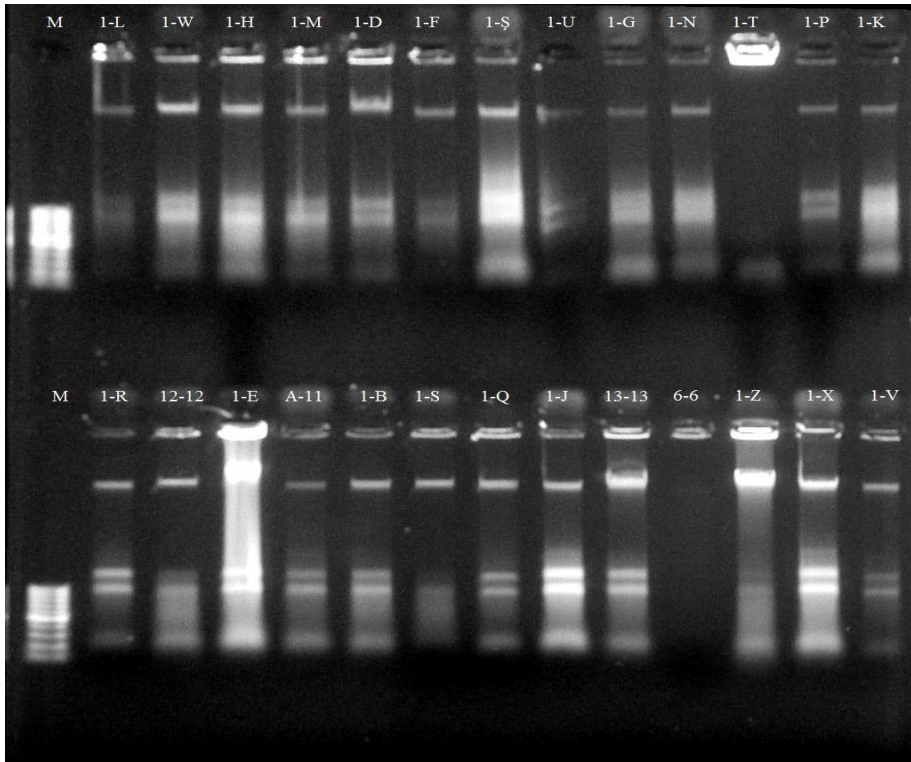
4.6.1. DNA İzolasyonu

80 *P. aeruginosa* izolatının genomik DNA izolasyonu 3.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. agaroz jel elektroforezinde bütün izolatların yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA'ya sahip oldukları tek bir bant halinde gözlenmiştir.

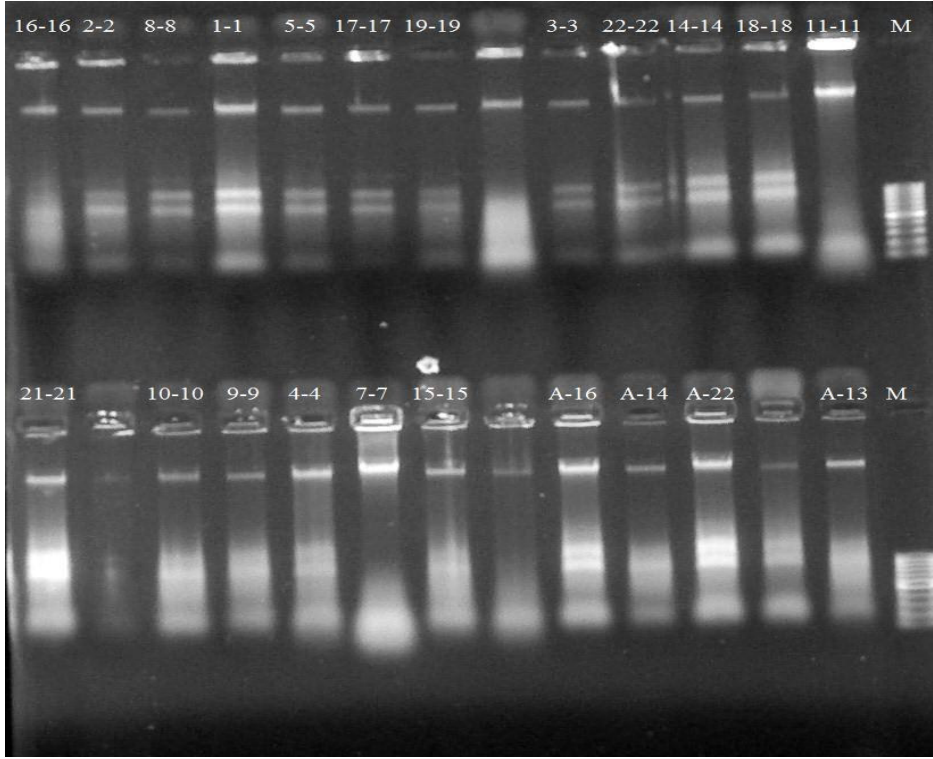
4.6.2. Plazmid DNA İzolasyonu

80 *P. aeruginosa* izolatının plazmid DNA izolasyonu 3.2.4.2.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. İzolatların plazmid içerikleri 3.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde agaroz jel elektroforezinde belirlenmiştir.

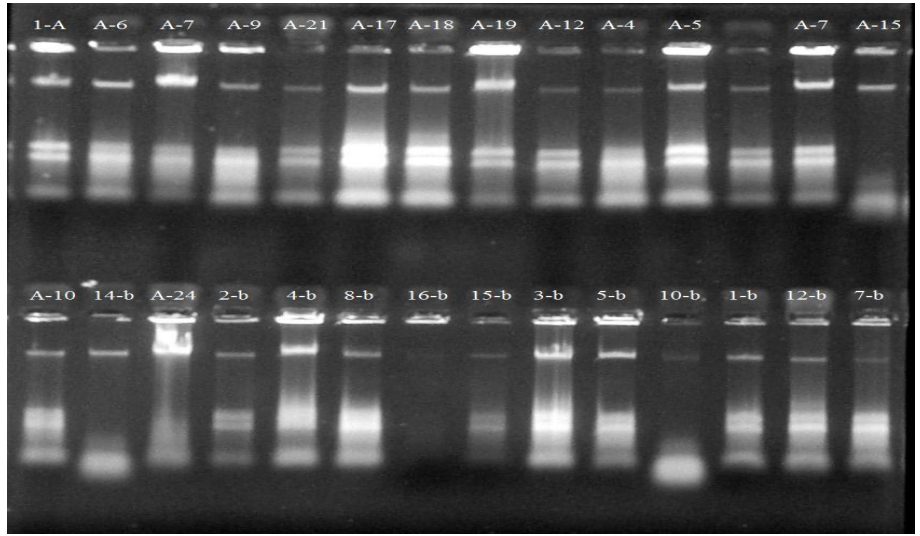
Elektroforezde başlangıç noktasına büyük molekül ağırlıklı tek bantlar genomik DNA olarak değerlendirilirken, Marker'a göre hızlı ilerleyen küçük molekül ağırlıklı DNA fragmentleri plazmid olarak değerlendirilmiştir. Marker'a göre plazmid DNA büyüklükleri 450-500 bp olarak belirlenmiştir. İzolasyon sonucu plazmid DNA profilleri incelenmiş ve 71 izolatın plazmid taşıdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3.).



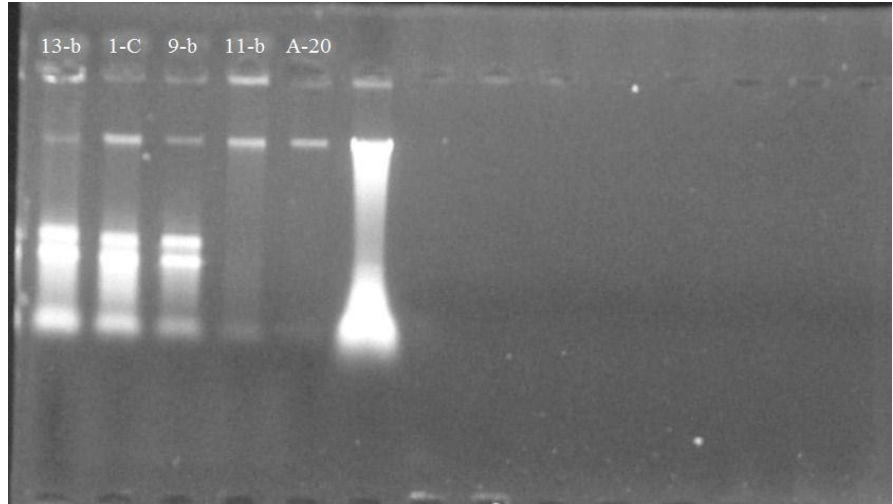
Şekil 4.8. *P. aeruginosa* izolatlarının plazmid profilleri-1. M: Marker DNA (O Gene Ruler 100 bp (Fermentas) 1.sıra: 1-14; M, 1-L, 1-W, 1-H, 1-M, 1-D, 1-F, 1-Ş, 1-U, 1-N, 1-T, 1-P, 1-K. 2.sıra: 1-14; M, 1-R, 12-12, 1-E, A-11, 1-B, 1-S, 1-Q, 1-J, 13-13, 6-6, 1-Z, 1-X, 1-V No'lu izolatlar.



Şekil 4.9. *P. aeruginosa* izolatlarının plazmid profilleri-2. M: Marker DNA (O Gene Ruler 100 bp (Fermentas) 1.sıra: 1-14; 16-16, 2-2, 8-8, 1-1, 5-5, 17-17, 19-19, 3-3, 22-22, 14-14, 18-18, 11-11, M. 2.sıra: 1-14; 21-21, 10-10, 9-9, 4-4, 7-7, 15-15, A-16, A-14, A-22, A-13, M No'lu izolatlar.



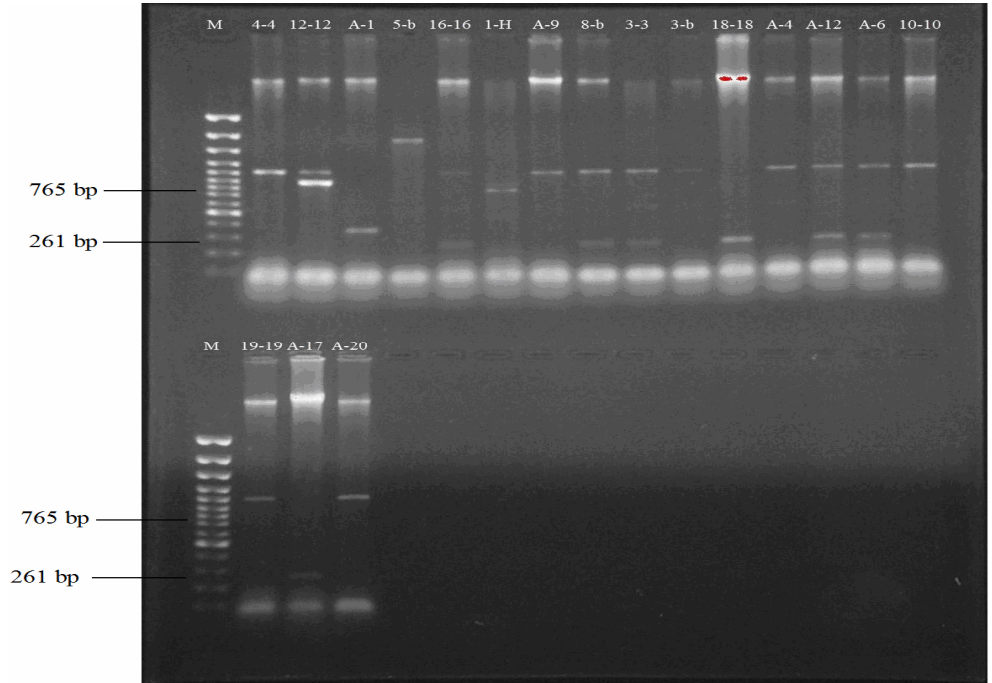
Şekil 4.10. *P. aeruginosa* izolatlarının plazmid profilleri-3. 1-A: Tip Tür
1.sıra: 1-14; 1-A, A-6, A-7, A-9, A-21, A-17, A-18, A-19, A-12, A-4, A-5, A-7, A-15. 2.sıra: 1-14; A-10, 14-b, A-24, 2-b, 4-b, 8-b, 16-b, 15-b, 3-b, 5-b, 10-b, 1-b, 12-b, 7-b No'lu izolatlar.



Şekil 4.11. *P. aeruginosa* izolatlarının plazmid profilleri-4. 1.sıra: 1-6; 13-b, 1-C, 9-b, 11-b, A-20 No'lu izolatlar.

4.6.3. Metallo-Beta (β) - Laktamaz genlerinin Multipleks PCR İle Saptanması

Çalışmada 80 *P. aeruginosa* izolatından imipeneme dirençli ve orta duyarlı olan 38 suş M β L genleri olan bla_{VIM} ve bla_{IMP} genlerinin varlığı açısından incelenmiştir. Bla_{IMP} genlerine spesifik kullanılan primerlerin PCR amplifikasyonu sonucu 765 bp ürün ve bla_{VIM} genlerine spesifik kullanılan primerlerin de 261 bp'lik ürün vermektedir. 38 izolatın 7'sinde (%18,4) 261 bp'lik bant saptanmıştır (A-17,16-16, 8-b, 3-3, 18-18, A-12, A-6 No'lu izolatlar). 1-H numaralı izolatda ise 765 bp'lik bant elde edilmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa* izolatlarının 15'inde (4-4, 12-12, A-1, 5-b, 16-16, 1-H, A-9, 8-b, 3-3, 3-b, A-4, A-12, A-6, 10-10, 19-19, A-20 No'lu izolatlar) , unspezifik bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Multipleks PCR analizi ile *P. aeruginosa* suşlarında bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerinin saptanması. M: DNA marker (O Gene Ruler 100 bp (Fermentas) 1.sıra: 1-16; M, 4-4, 12-12, A-1, 5-b, 16-16, 1-H, A-9, 8-b, 3-3, 3-b, 18-18, A-4, A-12, A-6, 10-10. 2.sıra: 1-4; M, 19-19, A-17, A-20. No'lu izolatlar.

4.6.4. Dizi Analizi

Multipleks PCR analizi sonucu bla_{IMP} ve bla_{VIM} geni taşıdığı belirtilen 8 izolata ait PCR ürünleri, bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerine spesifik primerler ile ODTÜ Teknokent'de otomatik bir DNA dizi analizi cihazı (ABI 3100 sekans analyser, Software, Applied Biosystem) ile dizi analizine alınmıştır.

Homoloji analizleri ise NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi), EMBL(Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)/GenBank (Gen Bankası)

ve DDBJ (DNA Japonya Veri Tabanı) veri tabanında gerçekleştirilmiştir. NCBI ve DDBJ veri tabanlarında yapılan hizalama sonuçları; şekil 4.13, şekil 4.14, şekil 4.15, şekil 4.16, şekil 4.17, şekil 4.18, şekil 4.19 ve şekil 4.20’de gösterilmektedir.

```

>AM886293.1 Ercherichia coli 1540 plasmid pP1206 complete genome.
      Length = 168113

Score = 56.0 bits (28), Expect = 8e-05
Identities = 34/36 (94%)
Strand = Plus / Plus

Query: 628      taaagatgatggccatcaagaccacaaggctacttcat 663
                |||||
Sbjct: 150321 taaagacgatggccatcaaaacccaaggctacttcat 150356

<u>amh<u>AJ585042.1<u> Pseudomonas aeruginosa partial int1 gene, aacA4 gene,
blaVIM-4 gene and partial qacEdelta1 gene
Length=2151

Score = 33.7 bits (36), Expect = 1e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 208      GTCGCCAGCATTTTCAT 225
                |||||
Sbjct 1262 GTCGCCAGCATTTTCAT 1279

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 170      ACGGACTTGCGA 181
                |||||
Sbjct 998 ACGGACTTGCGA 987

```

Şekil 4.13. A-6 VIMF5 No'lu izolatin BLAST analizi.

```
gb|AF318077.1| Pseudomonas aeruginosa integron InaB1 aminoglycoside 6'-N-  
acetyltransferase (aacC4), metallo-beta-lactamase (blaIMP-7), and  
aminoglycoside 3-N-acetyltransferase (aacC1) genes, complete cds  
  
Score = 19.3 bits (20), Expect = 0.90  
Identities = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)  
Strand=Plus/Plus  
  
Query 144 AGTGAAGTTG 153  
|||||  
Sbjct 1793 AGTGAAGTTG 1802  
  
Score = 17.5 bits (18), Expect = 3.2  
Identities = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)  
Strand=Plus/Plus  
  
Query 154 TCGCGCTTG 162  
|||||  
Sbjct 2195 TCGCGCTTG 2203
```

Şekil 4.14. A-17 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi

```

gb|AF318077.1| Pseudomonas aeruginosa integron InAB1 aminoglycoside 6'-N-
acetyltransferase (aacC4), metallo-beta-lactamase (blaIMP-7), and
aminoglycoside 3-N-acetyltransferase (aacC1) genes, complete cds
Length=2651

Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.59
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 474   GTAAGCGGCGC 484
           |||
Sbjct 484   GTAAGCGGCGC 474

```

Şekil 4.15. A-12 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi

```

>emb|Y18050.2| Pseudomonas aeruginosa int11, blaVIM, aacA4, aphA15, aadA1
and qacEdelta1 genes
Length=6601

Score = 33.7 bits (36), Expect = 1e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 215   GTCTCCACGCATTTCAT 232
           |||
Sbjct 3555   GTCTCCACGCATTTCAT 3572

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 214   GGTCTCCACGCA 225
           |||
Sbjct 2834   GGTCTCCACGCA 2823

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 177   ACGGACTTGCGA 188
           |||
Sbjct 3291   ACGGACTTGCGA 3280

>gb|AY152821.1| Escherichia coli class I integron integrase (intI) gene,
partial cds; 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase aac(6')-Ib (aac 6' Ib),
blaVIM-1 (vim-1), and quaternary ammonium resistance protein (qacEdelta1)
genes, complete cds; and sulfonamide resistance protein (sulI) gene,
partial cds
Length=2521

Score = 33.7 bits (36), Expect = 4e-05
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 215   GTCTCCACGCATTTCAT 232
           |||
Sbjct 1318   GTCTCCACGCATTTCAT 1335

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.070
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 177   ACGGACTTGCGA 188
           |||
Sbjct 1054   ACGGACTTGCGA 1043

```

Şekil 4.16. 18-18 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi

```

emb|AJ385042.1| Pseudomonas aeruginosa partial int1 gene, aacA4 gene,
blaVIM-4
gene and partial qacEdelta1 gene
Length=2151

Score = 33.7 bits (36), Expect = 3e-05
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 214 GTCTCCACGCACITTCAT 231
          |||
Sbjct 1262 GTCTCCACGCACITTCAT 1279

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.060
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 176 ACGGACTTGCGA 187
          |||
Sbjct 998 ACGGACTTGCGA 987

>emb|Y18050.2| Pseudomonas aeruginosa intI1, blaVIM, aacA4, aphA15, aadA1
and qacEdelta1 genes
Length=6601

Score = 33.7 bits (36), Expect = 1e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 214 GTCTCCACGCACITTCAT 231
          |||
Sbjct 3555 GTCTCCACGCACITTCAT 3572

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 213 GGTCTCCACGCA 224
          |||
Sbjct 2834 GGTCTCCACGCA 2823

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 176 ACGGACTTGCGA 187
          |||
Sbjct 3291 ACGGACTTGCGA 3280

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.18
Identities = 15/17 (88%), Gaps = 0/17 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 27 TGAGCCGGCAGGCGGTC 43
          || |||
Sbjct 6324 TGGGCGGCGAGGCGGTC 6308

>gb|AY152821.1| Escherichia coli class I integron integrase (intI) gene,
partial cds; 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase aac(6')-Ib (aac

```

Şekil 4.17. 16-16 VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi

```

>gb|AY033653.3
Pseudomonas aeruginosa isolate 96 plasmid pOZ176 transposon Tn21-like
resolvase (tnpR) gene, partial cds, and modulator of transposition (tnpM)
gene, complete cds; and Tn6016 integron DNA integrase(intI1),aminoglycoside
6'-N-acetyltransferase (aacA4), IMP-9 metallo-beta-lactamase (blaIMP-9),
aminoglycoside N (6')-acetyltransferase (aacA4), resolvase(tniR), TniQ
(tniQ), and NTF-binding protein (tniB) genes, complete cds, transposase
(tniAdelta) pseudogene, complete sequence, MerR (merR) gene, complete cds,
mer operon, complete sequence, and unknown gene
Length=12634

Score = 22.9 bits (24), Expect = 1.4
Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 209 GGTCTCCACGCA 220
          |||||
Sbjct 1771 GGTCTCCACGCA 1760

Score = 21.1 bits (22), Expect = 4.9
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 594 CCCGACTGCCT 604
          |||||
Sbjct 749 CCCGACTGCCT 739

Score = 21.1 bits (22), Expect = 4.9
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 511 CGTGCTCGGCA 521
          |||||
Sbjct 8243 CGTGCTCGGCA 8233

Score = 21.1 bits (22), Expect = 4.9
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 878 CAGCGTGTGGC 888
          |||||
Sbjct 11136 CAGCGTGTGGC 11126

Score = 21.1 bits (22), Expect = 4.9
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 745 CGCCGCCATCG 755
          |||||
Sbjct 11766 CGCCGCCATCG 11776

```

Şekil 4.18. 8-B VIMF5 No'lu izolatın BLAST analizi.

```

>gb|AF318077.1| Pseudomonas aeruginosa integron InAB1 aminoglycoside 6'-N-
acetyltransferase (aacC4), metallo-beta-lactamase (blaIMP-7), and
aminoglycoside 3-N-acetyltransferase (aacC1) genes, complete cds
Length=2651

Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.86
Identities = 13/14 (92%), Gaps = 0/14 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 179 GTCACACCGCGCCT 192
          ||||| |||||
Sbjct 538 GTCACACTGCGCCT 551

Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.86
Identities = 16/19 (84%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 386 GATGCACTTGGCCATAAT 404
          ||||| || |||||
Sbjct 2599 GATGCACTAAGCACATAAT 2617

Score = 19.3 bits (20), Expect = 3.0
Identities = 15/17 (88%), Gaps = 1/17 (5%)
Strand=Plus/Minus

Query 240 CGCTCTGATCGACCACT 256
          |||| ||| |||||
Sbjct 402 CGCT-TGACCGACCACT 387

Score = 19.3 bits (20), Expect = 3.0
Identities = 13/15 (86%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 159 ATTATCAGTCTATTC 173
          ||| ||| |||||
Sbjct 1470 ATTCTCAATCTATTC 1484

Score = 19.3 bits (20), Expect = 3.0
Identities = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 207 ATAAAACCGC 216
          |||||
Sbjct 1957 ATAAAACCGC 1948

Score = 19.3 bits (20), Expect = 3.0
Identities = 13/15 (86%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Minus

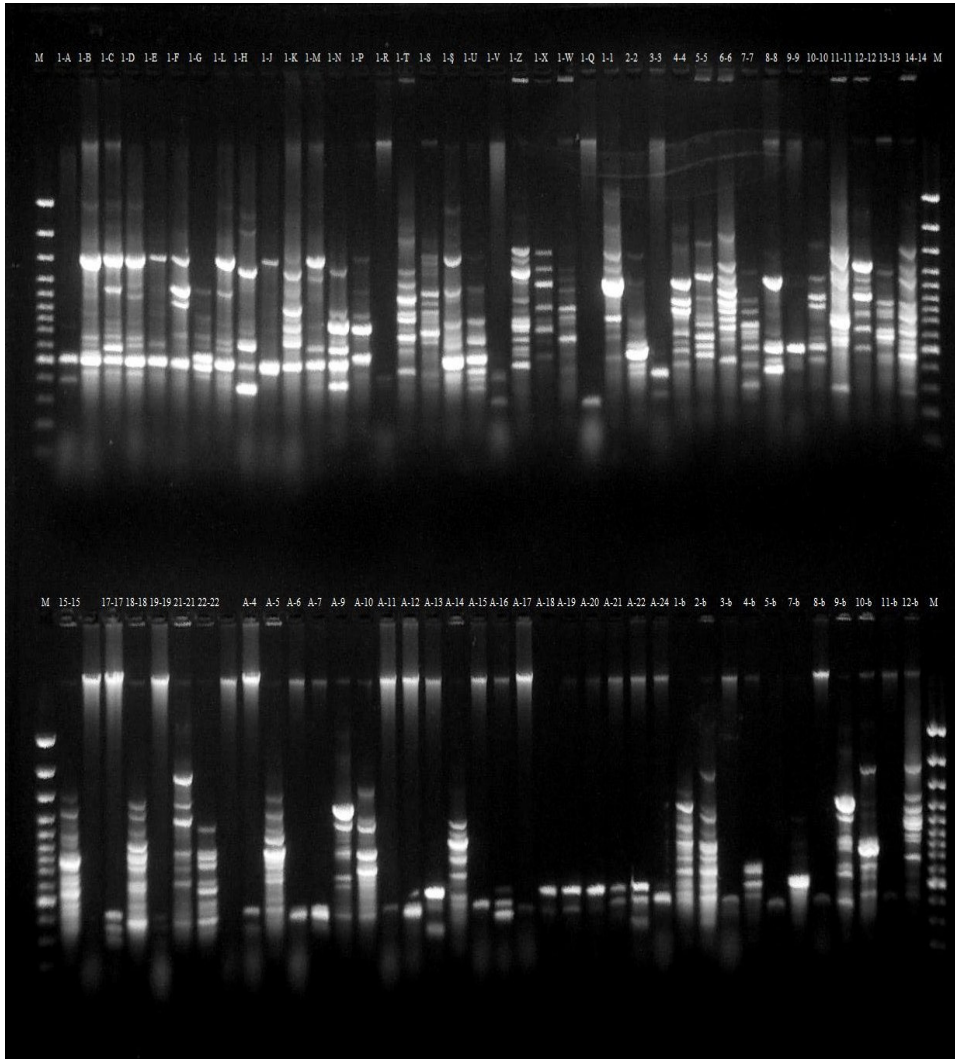
Query 180 TCACACCGCGCCTGC 194
          |||| |||||
Sbjct 2279 TCACTACGCGCCTGC 2265

```

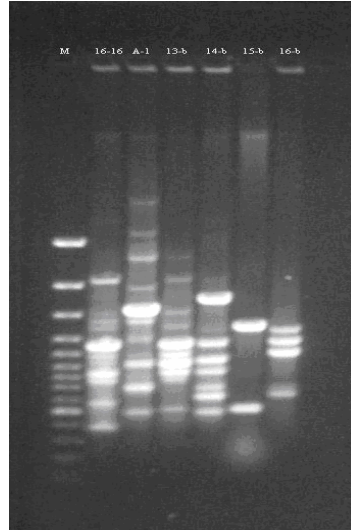
Şekil 4.19. 1-H IMPF5 No'lu izolatın BLAST analizi.

4.6.5. İzolatların Tiplendirilmesi (AP PCR)

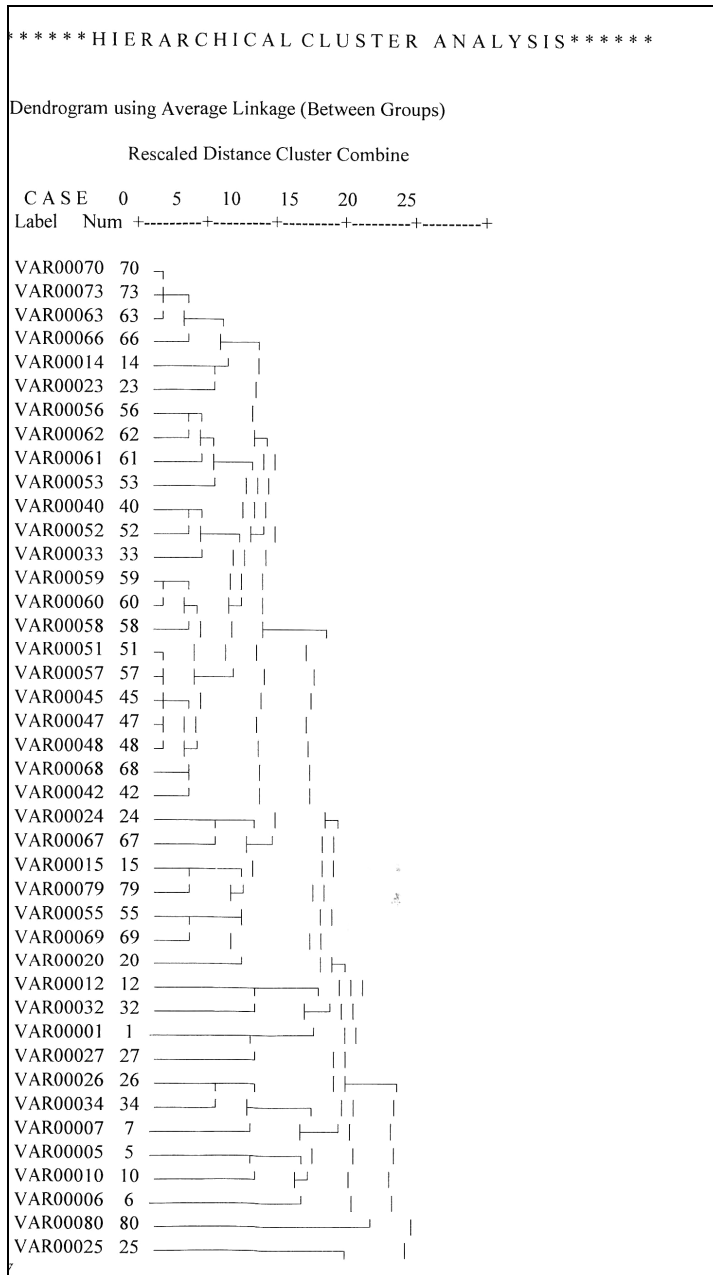
Dirençli izolatlar ile duyarlı izolatların profillerinin karşılaştırılması amacıyla SPSS (13.0) programı ile izolatların dendrogramı çizilmiştir.



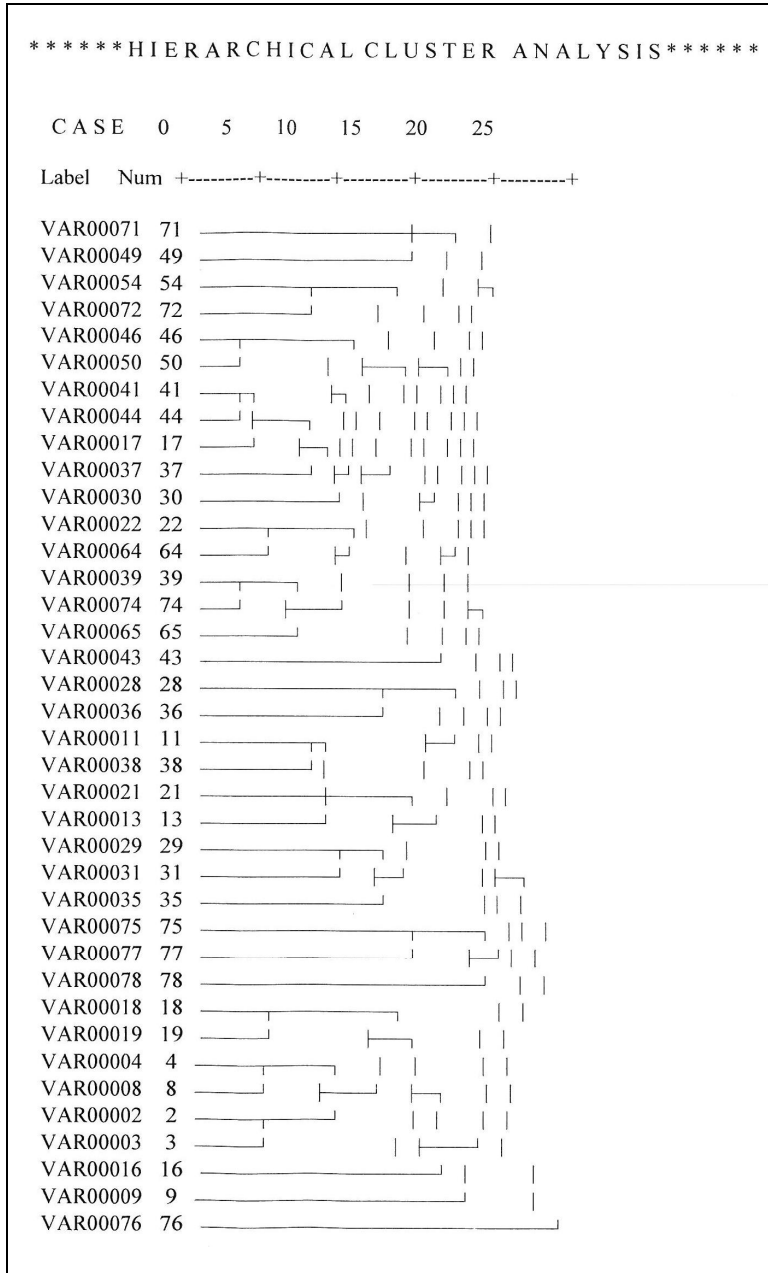
Şekil 4.21. AP- PCR yöntemi ile *P. aeruginosa* izolatlarının genotiplendirilmesi-1. M: Marker (O Gene Ruler 100 bp (Fermentas). 1.sıra: 1- 40; M, 1-A,1-B, 1-C, 1-D, 1-E,1-F,1-G, 1-L, 1-H, 1-J, 1-K, 1-M, 1-N, 1-P, 1-R, 1-T, 1-S, 1-Ş, 1-U, 1-V, 1-Z, 1-X, 1-W, 1-Q, 1-1, 2-2, 3-3, 4-4, 5-5, 6-6, 7-7, 8-8, 9-9, 10-10, 11-11, 12-12, 13-13, 14-14, M. 2.sıra: M, 1-40; M, 15-15, 17-17, 18-18, 19-19, 21-21, 22-22, A-4, A-5, A-6, A-7, A-9, A-10, A-11, A-12, A-13, A-14, A-15, A-16, A-17, A-18, A-19, A-20, A-21, A-22, A-24, 1-b, 2-b, 3-b, 4-b, 5-b, 7-b, 8-b, 9-b, 10-b,11-b, 12-b, M No'lu izolatlar.



Şekil 4.22. AP-PCR yöntemi ile *P. aeruginosa* izolatlarının genotiplendirilmesi-2 M: Marker (O Gene Ruler 100 bp (Fermentas). 1-A: Tip Tür. 1.sıra: 1-7; M, 16-16, A-1, 12-b, 14-b, 15-b, 16-b No'lu izolatlar.



Şekil 4.23. *P. aeruginosa* izolatlarının kümelenme analiz sonuçları-1



Şekil 4.24. *P. aeruginosa* izolatlarının kümelenme analiz sonuçları-2

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

P. aeruginosa normal koşullarda insan florasında bulunmayan gram negatif bir fırsatçı bir patojendir. Bu mikroorganizma genellikle toprak, su, sebze ve meyve ve çürümüş organik maddeler üzerinde bulunmaktadır (Yücel ve ark., 2006; Kasloff, 2008). Normal koşullarda sağlıklı bireylerde hastalığa sebep olmamasına rağmen, birçok hastane enfeksiyonuna neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir (Fidan ve ark., 2005).

P. aeruginosa hastane enfeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almakta, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (Senda et al., 1996; Gültekin ve ark., 2004; Toleman et al., 2005). Özellikle yoğun bakım ünitelerinden olmak üzere, hastane enfeksiyonu etkeni olarak en sık izole edilen fırsatçı patojenlerden biridir. Genel olarak hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (Gül ve ark., 2004).

Beş ayrı coğrafyadaki direnç oranlarını araştıran uluslararası SENTRY çalışmasına göre Latin Amerika ve Asya Pasifik bölgelerinde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının oranı Avrupa, ABD ve Kanada'dan daha yüksektir (Çelik, 2007). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar Asya, Kuzey ve Güney Amerika ve Avrupa'da büyük bir problem

olmaya devam etmektedir (Ohara et al., 2007). Bir araştırmada, Kistik fibrozisli hastalarda akciğer enfeksiyonlarının artışına sebep olan *P. aeruginosa* kolonizasyonunun mortalite ve morbitide oranlarını arttırdığı saptanmıştır. Bu nedenle *P. aeruginosa*'nın daha güvenilir bir şekilde saptanması gerekmektedir (Xu et al., 2004).

P. aeruginosa suşlarında artan antimikrobik direnç oranları son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır (Senda et al., 1996; Özgenç ve ark., 2002). *P. aeruginosa* genellikle çoklu antibiyotik direnci gösterebildiğinden tedavilerde de sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanımda olan antibiyotiklere karşı duyarlılığının izlenmesi uygun tedavi yönteminin saptanabilmesi açısından önem taşımaktadır. (Gül ve ark., 2004). Çeşitli direnç mekanizmalarına sahip olan *P. aeruginosa*'nın hastane kaynaklı suşlarının direnç oranlarının belirlenmesinin, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların ampirik tedavisine yardımcı olacağı düşünülmektedir (Özgenç ve ark., 2002).

P. aeruginosa hastane kaynaklı birçok servis ve materyalden izole edilmektedir. Araştırmamızda çalışılan 80 *P. aeruginosa* izolatının 6'sı (%7,5) büyük intaniye, 16'sı (%20) cerrahi, 33'ü (%41,25) yoğun bakım, 5'i (%6, 25) yenidoğan, 2'si (%2,50) nöroloji 6'sı (%7,50) üroloji, 3'ü (%3,75) hemodiyaliz ve 2'si (%2,50) çocuk intaniye servislerinden izole edilmiştir. Pitout et al., *P. aeruginosa* suşları üzerine yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada 2002-2006 yılları arası *P. aeruginosa* suşlarını kemik iliği organ nakli ve yoğun bakım ünitesinden izole etmişlerdir (Pirout et al., 2005). Strateva et al., 2001-2006 yıllarını kapsayan bir sürveyans çalışmasında *P. aeruginosa* suşlarını; cerrahi, ortopedi, dahiliye, pediatri, nöroloji ve yoğun bakım ünitelerinden izole

etmişlerdir. İzole edilen 203 *P. aeruginosa* suşunun 79'u idrar, 27'si trekeal asparat, 14'ü balgam, 12'si bronşit, 2'si plevral sıvı, 30'u cerrahi yara, 9'u drenaj, 7'si boğaz, 9'u kan, 9'u burun, 1'i kulak, 2'si rektal sürüntü ve 2'si safra materyallerinden ayrıştırılmıştır (Strateva et al., 2007). Aynı şekilde Kanada'da yapılan bir çalışmada da 241 imipenem dirençli *P. aeruginosa* suşunun 103'ü (%43) idrardan, 7'si (%7) kandan, 50'si (%21) yara'dan, 48'i (%20) solunum sistemi salgılarından ve kalan 23'ü (%9), diğer klinik salgılardan izole edilmiştir (Pitout et al., 2005). Ohara et al. Japonya'da yaptıkları bir sürveyans çalışmasında *P. aeruginosa* suşlarının %30'unu idrardan, %29'unu balgamdan, %7'sini gaita ve %6'sını kan materyallerinden izole etmişlerdir (Ohara et al., 2007).

Ülkemizde de klinik örneklerden *P. aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yücel ve arkadaşları *P. aeruginosa* suşlarını, trekeal asparat (%22), idrar (%22), yara (%15), balgam (%14) ve kan (%8) örneklerinden saptamışlardır (Yücel ve ark., 2006). İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapılan bir araştırmada, hastanenin Anesteziyoloji ve Reanimasyon yoğun bakım ünitesinde gelişen hastane enfeksiyonlarının %70-85'inin *P. aeruginosa* suşlarından kaynaklandığı saptanmıştır (Avcı ve ark., 2007). Pullukçu ve arkadaşları 24.776 idrar örneğinden 4.154 patojen saptamış ve bu patojenlerin %11,20'sinin *P. aeruginosa*'ya ait olduğunu rapor etmişlerdir (Pullukçu ve ark., 2006). Araştırmamızda 80 *P. aeruginosa* izolatının 1'i (%1,25) Trekeal asparat, 21'i (%26,25) idrar, 22'si (%27,50) kan, 21'i (%26,25) yara, 9'u (%11,25) balgam, 3'ü (%3,75) abse, 2'si (%2,50) göz ve 1'i (%1,25)

kulak materyallerinden izole edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının diğer çalışmalarda da olduğu gibi en çok yoğun bakım ve cerrahi ünitelerinden izole edildiği gözlenmektedir. Dünya'daki ve Türkiye'deki araştırmalara göre *P. aeruginosa*'nın en sık izole edildiği klinik materyaller idrar, kan, yara ve balgamdır. Çalışmamızda ayrıca %1-2 oranında göz ve kulak materyallerinden de *P. aeruginosa* izole edilmiştir.

P. aeruginosa'nın klinik materyallerden izolasyonu ve identifikasyonu sırasında kültürel ve mikroskopik yöntemler olduğu kadar otomatize sistemler de kullanılmaktadır. Çalışmamızda 80 *P. aeruginosa* suşunun izolasyonu sırasında Pseudomonas Agar (Difco) kullanılmıştır. Ohara et al., *P. aeruginosa*'nın izolasyonu sırasında Nalidiksik Asit-Setrimid Agar, Varaiya et al. ise izolasyon sırasında Brain Heart İnfüsion Agar (BHI), Kanlı Agar ve MacConkey's Agar kullanmışlardır (Ohara et al., 2007 ve Varaiya et al., 2008). Xu et al. ise *P. aeruginosa* suşlarını Pseudomonas Agar, Kanlı Agar ve McConkey Agar'ın bir kombinasyonunu hazırlayarak izole etmişlerdir (Xu et al., 2004).

Ohara et al., tanılamada mukoid koloni oluşumu, pigment üretimi ve gram boyama yöntemlerini kullanmışlardır (Ohara et al., 2007). Pitout ve arkadaşları *P. aeruginosa* suşlarını VITEC O sistem ile tanımlarken, Strateva et al. ise *P. aeruginosa* suşlarını BBL Enterik/Nonfermenter ID sistem ile tanılamışlardır (Pitout et al., 2007 ve Strateva et al., 2007). Hindistan'da Varaiya et al. kan kültürlerinden *P. aeruginosa* suşlarını Versa Trek Otomatize sistem ile tanılamışlardır (Varaiya et al., 2008). Fransa'da Vedel'in ve Poirel et al. yaptıkları

araştırmalarda *P. aeruginosa* suşlarını API 20 NE strip ile tanılamışlardır (Poirel et al., 2000 ve Vedel, 2005). Türkiye’de ise zgen ve arkadaşları 199 *P. aeruginosa* suşunun tanılanması, API 20 NE sistemini ve kontrol şuşu olarak da *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunu kullanılmışlardır (zgen ve ark., 2000). Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolasyonu için Pseudomonas Agar ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerlerindeki mukoid ve mavi-yeşil pigment oluşturan koloniler seçilmiştir. İzolatlar arasındaki oksidaz pozitif, gram negatif basillerin *P. aeruginosa* olarak n tanılaması yapılmış, ve son tanılama VITEC-2 otomatize sistem kullanılarak yapılmıştır (Ağuş, 2008). Tüm çalışmalarda kontrol şuşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olan *P. aeruginosa* suşlarında artan antibiyotik direnci son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır (zgen ve ark., 2002). İmipenem ve meropenem, aminoglikozidler, quinolonlar, sephalosporinler, polimiksin ve monobaktamlar günümüzde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı tedavide kullanılmaktadır ancak Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarının gelişmesine neden olmuştur (Toleman et al., 2005). Antibiyotik direnç durumları bölgelere ve hastanelere göre değişiklik gösterdiğinden her hastanede mikroorganizmanın antibiyotik direncinin izlenmesi ve ampirik tedavide bu verilerden faydalanılması gerekir (Gültekin ve ark., 2004). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça güçtür çünkü suşlar doğal dirence sahiptir ve aynı zamanda antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirmiştir (Strateva et al., 2007).

Seftazidim, Piperasilin-Tazobaktam gibi antibiyotikler enfeksiyon tedavisinde kullanılmaktadır fakat bu ajanlara direnç dünyanın bir çok bölgesinde önemli bir sorun haline gelmiştir. Çin’de yapılan bir araştırmada bla_{TEM-2} integron ilişkili bir gen 140 imipenem dirençli izolatın 14’ünde (%10) saptanmıştır. Kanada’da yapılan bir araştırmada ise genellikle oldukça düşük olarak izlenen aantibiyotik direncinin 2002-2006 yılları arasında yükseldiği ve suşların %14’ünün imipeneme dirençli oldukları saptanmıştır (Hawkey, 2008).

P. aeruginosa antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında genel olarak E-Test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon metotları kullanılmaktadır (Lee et al., 2003; Gibb et al., 2002). Toleman et al. NCCLS’in verilerine göre antibiyotik duyarlılık testi olarak tüp dilüsyon metodunu kullanmışlardır (Toleman et al., 2005). Pitout et al. MIK değerlerini VITEK, tüp dilüsyon ve E-test ile belirlemişlerdir. Türkiye’de de benzer duyarlılık testleri yapılmıştır. Yücel ve arkadaşları izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını disk difüzyon yöntemine göre araştırmışlardır (Yücel at al., 2006).

Araştırmamızda imipenem dirençli 28 izolatın 6’sı (%42,85) cerrahi alan enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Ayrıca 3 ’ü (%16,71) intaniye, 12’si (%43,85) yoğun bakım, 2’si (%7,14) üroloji, 1’i (%3,57) ortopedi, 2’si (%7,14) üroloji, 1’i (%3,57) ortopedi, 2’si (%7,14) dahiliyeden ve 1’i (%3,57) yenidoğan ünitesi ve 1’i (%3,57) nöroloji servisinden izole edilmiştir.

P. aeruginosa suşlarının antibiyotik duyarlılıkları üzerine Fransa’da yapılan bir çalışmada 241 imipenem dirençli *P. aeruginosa* suşunun 103’ü (%43) idrardan, 17’si (%7) kandan, 50 ‘si (%21) yara’dan 48’i (%20) solunum sistemi salgılarından izole edilmiştir (Pitout et al., 2005). Çalışmamızda ise imipenem dirençli 28 izolatın 9’u (%32,14) yara’dan, 6’sı (%21,42) idrar, 7’si (%25) kandan, ve 6’sı (%21,42) balgamdan izole edilmiştir. Mısırdan Amer et al., 25 imipenem dirençli *P. aeruginosa* suşunun 9’unu (%36) üriner sistem, 8’ini (%28) solunum sistemi ve 3’ünü (%12) cerrahi alan enfeksiyonlarından izole etmişlerdir (Amer et al., 2007). İmipenem dirençli klinik materyallerin kendi arasındaki direnç dağılım yüzdeleri ise; yara materyalinde 21 izolatın 9’u (%42), idrarda 21 izolatın 6’sı (%28), kan materyalinde 22 izolatın 7’si (%31,81) ve balgam materyalinde ise 9 izolatın 6’sı (%66,66) imipenem direnç göstermektedir. Bu verilere göre imipenem dirençlilik yüzdesinin en yüksek saptandığı materyaller sırasıyla balgam (%66,66), yara (%42), kan (%31,81) ve idrar (%28)’dir.

Fransa’da yapılan diğer çalışmaya göre 241 *P. aeruginosa* izolatının duyarlılık oranları %20 piperasiline, %59 Tobramisine ve %72 gentamisin’e dirençli olarak saptanmıştır (Pitout et al., 2005).

Türkiye’de ise Pullukçu ve arkadaşları yatan hastaların %21,9’unda, poliklinik hastalarının ise %11,1’inde imipenem direnci saptamışlardır (Pullukçu ve ark., 2006). Ayrıca Sesli ve arkadaşları cerrahi alan enfeksiyonlarında izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %95’inde imipenem direnci saptamışlar (Sesli ve ark., 2006). Çalışmamızda da olduğu gibi cerrahi alan enfeksiyonlarından izole edilen

P. aeruginosa suşlarında imipenem direnci artmakta ve bu direnç, Türkiye'nin değişik bölgelerinde farklılıklar göstermektedir.

Türkiye ve Dünya genelinde karbapenem grubu antibiyotikler ve β -laktam grubu antibiyotiklerin (Sefeperazon-sulbaktam ve Piperasilin-Tazobaktam) duyarlılık profilleri saptanmaktadır. Yapılan bu çalışmada 80 *P. aeruginosa* izolatının 28'i (%35) IMP dirençli, 27'si (%33,50) SCF ve 23'ü (%28,75) TZP dirençli olarak saptanmıştır.

Hindistan'da yapılan bir araştırmada 240 *P. aeruginosa* izolatının %25'i karbapeneme dirençli %42'si piperasilin-tazobaktama dirençli %75'i sefeparozon-Sulbaktam'a dirençli bulunmuştur (Varaiya et al., 2008). Yunanistan'da ise duyarlılığı VITEC-2 ile saptanan 47 *P. aeruginosa* izolatının 44'ünde imipenem direnci belirlenmiştir (Pounaras et al., 2003). Zavascki et al. %40,50 oranında Piperasilin-Tazobaktam direnci, %40 oranında yatan hastalardan imipenem direnci saptamışlardır (Zavascki et al.,2006). Türkiye'de de benzer araştırmalar sonucu TZP (%86), IMP (%56), SCF(%46) oranında direnç saptanmıştır (Sesli ve ark., 2006). Pullukçu ve arkadaşları gram negatif bakteriler ve direnç oranları üzerinde yapmış oldukları bir sörveyans araştırmasında *P. aeruginosa* suşlarında (%26) TZP, (%26) IMP, (%28,50) SCF direnci belirlemişlerdir. Ayrıca Fidan ve arkadaşları (%25) TZP, (%23) SCF, (%15) oranında imipenem direnci belirlemişlerdir (Fidan ve ark., 2005). Verilere göre özellikle karbapenem grubuna dahil olan imipenem antibiyotiğinde yapılan çalışmalara göre direncin artış gösterdiği, Beta-laktam grubu antibiyotik olan SCF ve TZP'ın diğer çalışmalara göre araştırmamızda direnç oranının arttığı saptanmıştır.

P. aeruginosa'ya bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde çeşitli antimikrobiyal ajanlar kullanılabilir. Sepsis vakalarında; seftazidim, sefepim, meropenem veya imipenem tek başına kullanılabileceği gibi piperasilin-tazobaktam ile amikasin kombinasyonu veya karbapenem grubu bir antibiyotik ile aminoglikozid grubundan bir antibiyotiğin kombine edilerek kullanılabileceği bildirilmektedir. *P. aeruginosa* ile gelişen pnömoni tedavisinde aminoglikozidlerin tek başına yeterli olmadıkları görüldüğünden beta-laktam antibiyotik ile kombine edilmesi tavsiye edilmektedir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde ise tek başına kullanılacak bir antimikrobiyal ajanın yeterli olduğu gözlenmiştir. Buna karşın yanık hastalarında ise mutlaka kombine tedavi uygulanması gerektiği bildirilmiştir (Sarı, 2005).

Beta-laktamazlar, beta-laktam antimikrobiyal ajanlarına karşı oluşan bakteriyel direncin en yaygın sebebidir. β -laktamazlar için birkaç sınıflandırma sistemi yayınlanmıştır. β -laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları ve plazmid yada kromozomal olarak kodlanmalarına göre sınıflandırılmışlardır (Livermore, 1995).

Sınıf B Metallo- β -laktamazlar (M β L), karbapenemleri hidroliz edebilen ve çoğu beta-laktamaz inhibitörlerine karşı direnç oluşturan fakat metal iyon şelatörlerinin inhibisyonuna duyarlı olan β -laktamaz sınıfıdır. Bu enzimlerin çoğu sefaloprinleri ve penisilinleri hidroliz etme yeteneğinde fakat, aztreonamları hidroliz edememektedir. Hidroliz yetenekleri enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko iyonundan gelmektedir. En sık gözlenen M β L enzimleri VIM, IMP, GIM ve

SPM'dir. Bu enzimler kromozomal olmakla birlikte gen kasetlerinde taşınan integronlarda lokalize olmuşlardır. Bu integronlar plazmid veya transpozona integre olduğunda bakteriler arasında mutlaka transferi gerçekleşmektedir. Transfer edilebilir IMP tipi ilk defa 1990 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır. VIM tipi MβL'lar ise ilk defa İtalya'da 1997 yılında rapor edilmiştir. Diğer MβL tipi olan SPM ve GIM çok fazla yayılış göstermemektedirler ancak VIM ve IMP tipi MβL'lar dünya genelinde gittikçe yaygınlaşmakta ve önemli bir sorun oluşturmaktadır (Queenan et al., 2007).

Bu güne kadar MβL'ların genellikle integronlarda taşındığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Ancak 2008 yılında Sacha et al., yeni bir genetik element olan ISCR (ISCR-IS Common Region)'nin de antibiyotik direncinin yaygınlaşmasında oldukça ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Toleman et al. *P. aeruginosa*'da ISCR genetik elementinde bla_{VIM-1} genini saptamışlardır (Sacha et al., 2008).

Tedavilerinde karbapenem antibiyotiklerinin tercih edildiği enfeksiyonlarda etkeni izole etmek kadar etkenin karbapenemaz ve MβL üretimini basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla tespit etmek de önem kazanmaktadır. MβL üreten izolatların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında erken tanısı hem dirençli izolatın yayılmasını önlemek hem de kilinisyeni tedavi konusunda bilgilendirebilmek için son derece önemlidir. Bu güne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde MβL enziminin tespitine yönelik çeşitli fenotipik testler uygulanmıştır. Ne varki ESBL (Geniş spektrumlu beta-laktamaz)'larda olduğu gibi CLSI kriterlerine göre izolatlarda MβL üretimini tespit etmede geçerli bir metod henüz

oluşturulamamıştır. Ancak double disk sinerji testi, imipenem-EDTA kombine disk testi, M β L E-Test, Modifiye Hodge testi gibi çeşitli yöntemleri kullanan çalışmalar yapılmakta ve sonuçlar PCR sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmaların bazıları olumlu sonuç verirken bazılarında yalancı pozitifliğin yüksek olduğu görülmektedir (Sarı, 2005 ve Çakar, 2005).

Fenotipik yöntemlerin hemen hepsi, inhibitör maddenin ortama eklenmesi ile enzim inhibisyonunun gözlenmesi temeline dayanır. Yong et al., İmipenem ve İmipenem+EDTA diskleri kullanılarak rutin metallo enzim araştırılması için kullanılabilecek bir yöntemin geliştirildiğini bildirmiştir. Migliavacca et al. yine imipenem ve EDTA ile bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirmişler ve yaklaşık %95 duyarlılık ile M β L tespiti yapılabildiğini bildirmişlerdir. Toreman ve arkadaşları enzim üretiminin saptanması için kullanılabilecek besiyerleri ve inhibitör maddeleri karşılaştırmış, MHA en uygun besiyeri, EDTA ise en başarılı inhibitör madde olarak bildirilmiştir (Toreman ve ark., 2005). Araştırmamızda da kullandığımız double disk sinerji yönteminde inhibitör madde EDTA ve besiyeri de MHA'dır.

Çalışmamızda 80 *P. aeruginosa* izolatu M β L varlığını araştırmak amacıyla double-disk sinerji testine tabi tutulmuştur ve 80 suşun 27 (%33, 75)'si M β L pozitif olarak saptanmıştır. İmipenem dirençli 18 izolatta (%22,50) M β L pozitif olarak belirtilmiştir.

Japonya'da 1998-2002 yılları arasında bütün bölgelerde artan karbapenem direnci sonucu her merkezde en az 1 M β L olgusu

gözenmiştir. Lee et al., *P. aeruginosa* izolatlarının %11'inin imipenem dirençli olduğunu ve dirençli izolatlar arasında %8,7'sinin MβLürettiğini göstermişlerdir. Kore'de 28 hastane'yi kapsayan çok merkezli bir çalışmada ise imipeneme duyarlı olmayan 387 *Pseudomonas spp.*'nin %11,4 'ünde MβL üretimi ortaya konmuştur. Luzzarro F et al. İtalya'da karbapenem ve seftazidim dirençli 82 *P. aeruginosa* izolatında Etest MβL stripleri ile %9,8, buyyon diküsyon testi ile %13,4 olarak MβL üretimi rapor edilmiştir (Sarı, 2005). Ohara et al., 100 suşun 14'ünde (%14) MβL pozitif olarak saptamışlardır (Ohara et al., 2007). Varaiya et al. ise 240 *P. aeruginosa* izolatının 60'ını (%25) karbapenem dirençli 50'sini (%20,8) MβL pozitif olarak rapor etmişlerdir (Varaiya et al., 2008).

Türkiye'de MβL prevalansını yansıtan uluslararası yayınlanmış çalışmalar bulunmaktadır. Altoparlak ve arkadaşları, Erzurum'da karbapenemlere dirençli 40 *P. aeruginosa* suşunun IMP-EDTA kombine disk yöntemi ile 22'sinde (%55) pozitiflik bulmuşlardır (Altoparlak ve ark., 2005). Toraman ve arkadaşları Elazığ'da karbapenemlere dirençli 52 *P. aeruginosa* izolatının 15'inde (%29) MβL üretimini tespit etmişlerdir (Sarı, 2005). Fırat Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden 407 *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. E-Test-MβL stripleri ile karbapenem dirençli suşlarda MβL araştırması yapılmış ve 42 *P. aeruginosa* suşunun 10'unda (%24) MβL üretimini saptanmıştır (Toreman ve ark., 2005). Fidan ve arkadaşları çalışılan 40 *P. aeruginosa* suşundan 2'sinde (%5) double disk sinerji ve modifiye hodge testi ile MβL enzimi saptamışlardır (Fidan ve ark., 2005).

Araştırmamıza göre MβL sıklığının çalışmamızda %33,75’lik bir yüzdeye sahipken, Dünya genelinde MβL enziminin saptanma sıklığının %8,7-15’lik ülkemizde ise %5-55’lik bir yüzdeye sahip olduğu gözlenmektedir. MβL enzimi, çalışmamızda olduğu kadar diğer araştırmalarda da giderek artan bir tehlike olduğu belirtilmektedir ve bu durum antibiyotik tedavisi sırasında gelişen MβL direnç sorununu tekrar güncelleştirmektedir. Dolayısı ile farklı coğrafyalarda MβL enziminin saptanma yüzdesi değişiklik göstermektedir.

İntegronlarda taşınan MβL genlerinin plazmidler veya transpozonlar aracılığı ile bakteriler arasında yaygınlaştığı birçok araştırmada rapor edilmiştir. Dolayısı ile plazmid profillerinin ve plazmid miktarlarının özellikle *P. aeruginosa* olmak üzere antibiyotik direncine sahip diğer nozokomiyal etkeni mikroorganizmalarda araştırılması gerekmektedir.

Nikbin et al. plazmid izolasyonunda “alkali-lizis” yöntemini kullanmışlar ve plazmid DNA’yı %0,7’lik agaroz jel elektroforezinde yürütmüşlerdir. 104 *P. aeruginosa* izolatının 31’inde (%29,8) plazmid DNA saptamışlardır (Nikbin et al., 2007). Çalışmamızda plazmid DNA izolasyonu “kaynatma” yöntemi ile yapılmıştır ve plazmid DNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Çalışmamızda plazmid büyüklüğünün 450-500 bp olduğu gözlenmektedir. Xiong et al., 54 *P. aeruginosa* suşunun 7’sinde saptadıkları konjugatif plazmid büyüklüğünün 450 bp olduğunu saptamışlardır (Xiong et al., 2006). Çalışmamızda 80 *P. aeruginosa* suşunun 71’inin (%88,75) plazmid

taşıdığı saptanmıştır. Ayrıca, plazmid DNA'ya sahip 30 (%37,50) suşun imipenem dirençli ve orta duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Nikbin et al. plazmid DNA taşımayan suşlarda antibiyotik direncinin çoğunun kromozomal olduğunu belirtmişler ve plazmid içeren izolatların ise en az 8 antibiyotiğe dirençli olduklarını ve bu durumun çoklu direnç gösteren suşlarda plazmidin bulunmasının önemli olduğunu rapor etmişlerdir (Nikbin et al., 2007). Plesiat et al. ise plazmid profilinin belirlenmesini epidemiyolojik bir araç olarak göstermişlerdir. 450 *P. aeruginosa* izolatında plazmidin bulunma sıklığını araştırmışlar ve bu verileri diğer epidemiyolojik analizler ile karşılaştırmışlardır. Plazmid içeren *P. aeruginosa* izolatlarının yaklaşık %13,9'unun antibiyotiklere direnç gösterdiklerini belirtmişlerdir (Plesiat et al.,1988). Bizim çalışmamızda da imipenem direncine sahip 30 izolatın aynı zamanda plazmid de taşıdığı gösterilmiştir.

MβL genlerinin tespitinde PCR analizleri güvenilir genotipik bir yöntemdir. PCR analizinde bla_{VIM} veya bla_{IMP} genlerinin korunmuş bölgelerine özgü farklı primer seti kullanıldığı gibi gene özgü primer seti de kullanılabilir. PCR sonucu elde edilen ampikonun sekans analizinin yapılmasının faydalı olacağı belirtilmektedir. Zira VIM benzeri yada IMP benzeri enzimler birbirinden genellikle bir yada iki amino asit farkı ile ayrılmaktadırlar (Çakar, 2005).

Ülkemizde Hacettepe Üniversite'sinde yapılan bir çalışmada bla_{VIM} genlerinin korunmuş bölgelerine spesifik 2 farklı primer seti ile PCR analizi gerçekleştirilmiş 1. set ile bla_{VIM} genine spesifik 261 bp'lik

bir ampikon elde edilmesi amaçlanmıştır. Toplam 110 *P. aeruginosa* izolatından 11 izolat bla_{VIM} genleri açısından pozitif bulunmuştur. Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada ise, Bahar ve arkadaşları 2003 yılında Ankara SSK Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kalp-Damar Cerrahisi bölümünde tedavi gören hastadan izole edilen *P. aeruginosa* GB-K5 şuşunda bla_{VIM-5} tipi MβL genini saptamışlardır (Çakar, 2005 ; Bahar ve ark., 2004). Çalışmamızda imipenem dirençli ve orta duyarlı 38 *P. aeruginosa* izolatı multipleks PCR analizine alınmıştır. İki farklı primer çifti (bla_{IMP} 765 bp ve bla_{VIM} 261 bp) kullanılmıştır. Yedi şuşta bla_{VIM} geni ve bir şuşta bla_{IMP} geni olmak üzere %10 oranında MβL geni saptanmıştır. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yapılan bir araştırmaya göre farklı klinik materyallerden izole edilen 100 *P. aeruginosa* şuşunun 1'inin (%1) bla_{VIM} geni taşıdığı, 9'unun (%9) bla_{IMP} geni taşıdığı belirtilmiştir (Özgümüş ve ark., 2007). Araştırmamızda ayrıca, fenotipik olarak saptanan dirençlilik oranı %47,50 iken genotipik olarak %10 olarak MβL saptanmıştır. Bu durum izolatların sahip oldukları direnç genlerinin tümünün genotipik olarak belirlenemediğini göstermektedir. *P. aeruginosa* şuşlarında MβL direncine neden olan toplam dört tip MβL enzimi bulunmaktadır. Bu enzimler IMP, VIM, SPM ve GIM'dir. SPM ve GIM tek bir allele sahipken, IMP tipi MβL enziminin 18 farklı alleli, VIM tipi MβL enziminin ise 11 farklı alleli bulunmaktadır (Walsh et al., 2005). Çalışmamızda MβL genlerinin PCR ile saptanmasında en yaygın olduğu bilinen iki gen (bla_{IMP} ve bla_{VIM}) için spesifik primer çiftleri kullanılmıştır. Toplam 4 gen ve 29 allel'den 2 genin 1'er alleli genotipik olarak araştırılmıştır. Bu alleller bütün MβL genlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadırlar. Çalışmamızda

fenotipik olarak M β L ürettiği saptanan ancak genotipik olarak M β L genleri saptanamayan 19 izolatın, diğer M β L genlerine sahip oldukları düşünülmektedir. Ancak bu izolatların hangi genlere ve hangi allellere sahip olduklarının saptanması için allel spesifik 27 farklı primerle daha PCR yapılması gerekmektedir.

Kanada’da 2008 yılında izole edilen 416 *P. aeruginosa* suşunun 57’sinin hem fenotipik hem de genotipik olarak M β L enzimini taşıdığı saptanmıştır (Pitout et al., 2008). İtalya’da Multiplex PCR sonucu, M β L testi pozitif olan 15 izolatın 7’sinde (%46,66) bla_{VIM} ve bla_{IMP} geni taşıdığı rapor edilmiştir (Pagani et al., 2005). Pournaras et al., 53 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşunun 47’sinde (%88,7) bla_{VIM} genini saptamışlardır (Pournaras et al., 2003). Çalışmamızda da 38 *P. aeruginosa* izolatının 7’sinde (%18,42) bla_{VIM} geni saptanmıştır. Pournaras et al., 47 suşta bla_{IMP} geni saptayamamıştır ancak bizim çalışmamızda 1 suşun (%2,63) bla_{IMP} geni taşıdığı rapor edilmiştir .

Amerika’da yapılan diğer bir çalışmada ise Xiong et al. E-test M β L testi ile 29 *P. aeruginosa* izolatının 19’unda M β L enzimini pozitif olarak saptamışlardır. Ancak 29 izolat bla_{IMP-1} ve bla_{VIM-2} geni açısından pozitif olarak bildirmişlerdir. E test M β L ve PCR arasındaki farklılığı *P. aeruginosa* izolatları arasında IMP ve VIM dışında farklı M β L enzimlerin bulunabileceği şeklinde açıklamışlardır (Xiong et al., 2006). Çalışmamızda yapılan bu araştırmada 38 *P. aeruginosa* izolatının 8 tanesinde (%21,05) M β L geni saptanmıştır. Sekiz suşun aynı zamanda double disk sinerji testi pozitif ve imipenem dirençli izolatlardır. Dolayısı

ile bla_{IMP} ve bla_{VIM} geni taşıyan *P. aeruginosa* izolatlarının VIM ve IMP tipi MβL enzimi taşımaktadırlar.

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda MβL genleri genotipik olarak %46-88 oranında saptanırken, ülkemizde yapılan çalışmalarda direnç genleri %1-18 oranlarında saptanabilmiştir (Pournaras et al., 2003; Pagani et al., 2005; Özgümüş et al., 2007). Dünya genelinde ve ülkemizde bu MβL genlerinin saptanma oranları arasında bu kadar fark olması ülkemizde MβL genlerinin genotipik olarak saptanması için yeterli sürveyans çalışmalarının yapılmadığını göstermektedir.

MβL genlerinin hemen hemen her yerde saptanmaya başlaması, bu genlerin devamlılığını ve geniş bir coğrafyaya dağılım gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu yüzden bu enzimler üzerine geniş ve detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Bakteriyel moleküler tiplendirme metodlarının ilk jenerasyonu plazmid profilinin belirlenmesidir. Ancak bu yöntem yerini kromozomal DNA üzerinde yoğunlaşan PFGE, FRLP, RAPD ve AP-PCR gibi moleküler tiplendirme yöntemlerine bırakmıştır. Genotiplendirme ile tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak salgın esnasında toplanan epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak ilişkili olup olmadıklarını araştırmaktır (Durmaz, 2009).

Günümüzde hastane enfeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarının genotiplendirilmesi birçok moleküler biyolojik yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerin başlıcaları ise AFLP, PFGE,

DNA dizi analizi ve RFLP'dir. Ancak bu teknikler doğru şekilde ayırt etmelerine rağmen rutin analizlerde kullanılmak için oldukça kompleks, zaman alıcı, çok fazla laboratuvar çalışması ve pahalı malzeme gerektiren, bütün bunların yanında da pahalı cihazlara ihtiyaç duyulan metotlardır. Ayrıca bu teknikler rutin uygulama için çok zor ve oldukça fazla tecrübe gerektirmektedir (Uzel, 2002). Çalışmamızda tanılanan *P. aeruginosa* suşlarının genotiplendirilmesi için AP-PCR yöntemi kullanılmıştır. Kullandığımız bu yöntem ile bilgilendirici primerlerin ve referans suşların mevcudiyetinde pahalı cihaz ve malzemelere gerek kalmadan identifikasyon yapılabilmektedir. AP-PCR ile izolatlar besiyerinde bir kere çoğaltılıp DNA izolasyonu yapıldıktan sonra genotiplendirme sonuçları kısa sürede alınabilirken PFGE tekniğinde bu işlem birkaç gün alabilmektedir. RFLP sonuçlarının alınması için ise ya probler ile hibridizasyona ya da PCR ürünlerinin enzimatik kesimine gerek duyulmaktadır (Uzel, 2002).

Moleküler biyolojik bir metodun epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için; birbirlerine çok yakın olan suşları ayırt edebilmesi, hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilmesi ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olması gerekmektedir. AP-PCR tekniği de bir tiplendirme metodunun sahip olması gereken bütün özellikleri karşılamaktadır. (Uzel, 2002). Günümüzde PFGE altın standart kabul edilmesine rağmen bu çalışmamızda yukarıda belirtilen sebeplerden ve laboratuvar imkanlarımızdan dolayı genotiplendirmede AP-PCR yöntemi kullanılmıştır (Çetinel Aksoy, 2008).

Araştırmamızda çeşitli klinik materyallerden izole ettiğimiz 80 *P. aeruginosa* suşunun AP-PCR ile tiplendirilmesi yapılmıştır ve SPSS (13.00) programı ile istatistiksel analize alınmıştır. Yapılan istatistiksel analiz ile *P. aeruginosa* suşları arasındaki klonal ilişkiyi gösteren bir dendrogram çizilmiştir. Libisch et al., *P. aeruginosa* izolatlarının tiplendirilmesinde PFGE metodunu kullanmış ve kümelenme analizini Fingerprinting II Informatix™ programı ile gerçekleştirmişlerdir (Libisch et al., 2008). Lee et al., kolistine duyarlı, fakat tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olan *P. aeruginosa* izolatlarının genotiplendirilmesinde PFGE analizi sonucu kümelenme analizini GelCompar II Software programı ile gerçekleştirmişlerdir (Lee et al., 2007). Çalışmamızda toplam 80 *P. aeruginosa* izolatı arasında 17 farklı küme saptanmıştır (Şekil 4.21 ve 4.22). Bu gruplar; 1 (5-b, 9-b, A-21 No'lu izolatlar), 2 (A-9, A-15, 22-22 No'lu izolatlar), 3 (A-4, A-5, 22-22 No'lu izolatlar), 4 (1-K ve 1-Z No'lu izolatlar), 5 (5-b, A-21, 1-b, 1-P, 1-W No'lu izolatlar), 6 (A-14, A-20, A-19, A-11 No'lu izolatlar), 7 (16-16, A-10, 9-9 No'lu izolatlar), 8 (A-17, A-18, A-16 No'lu izolatlar), 9 (A-9, A-15, 22-22 No'lu izolatlar), 10 (2-2 ve 1-G No'lu izolatlar), 11 (17-17, 21-21, 1-S No'lu izolatlar), 12 (15-15, 10-b, A-24 No'lu izolatlar), 13 (1-K, 14-14, 1-Z, 1-N No'lu izolatlar), 14 (5-5, 7-7, 11-11 No'lu izolatlar), 15 (1-Ş ve 1-U No'lu izolatlar), 16 (1-D ve 1-L No'lu izolatlar), 17 (1-b ve 1-C No'lu izolatlar) olarak belirlenmiştir. 17 farklı grup incelendiğinde *P. aeruginosa* suşlarının heterojen bir dağılım gösterdikleri ve belirli bir ortak kökene dayanmadıkları görülmektedir. 2. grup ve 12. gruptaki toplam 6 suşun tamamı imipeneme karşı dirençli iken 4, 10, 13, 15, 16 ve 17. gruplardaki toplam 14 suşun imipeneme karşı duyarlı olduğu

görülmektedir. Diğer gruplar arasında ise antibiyotik duyarlılıkları bakımından bir korelasyon saptanamamıştır. Kalan bütün gruplar imipenem bakımından hem dirençli hem de duyarlı suşları içermektedirler.

İmipeneme dirençli 2. grup *P. aeruginosa* suşlarının plazmid profilleri incelendiğinde A-9 ve 22-22 No'lu suşlarda plazmid bulunurken, A-15 No'lu suşun plazmid içermediği saptanmıştır. 12. grupta bulunan suşların tamamı ise plazmid içermemektedirler. İmipeneme hem duyarlı hem de dirençli olan klonal gruplardan 6.grupta A-20 No'lu suşun, 9.grupta A-15 No'lu suşun ve 14.grupta ise 7-7 ve 11-11 No'lu suşların plazmid içermekdikleri saptanmıştır.

Şener ve arkadaşları kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarını AP-PCR yöntemi ile tiplendirmiş ve bu araştırma ile hastalara ait izolatların moleküler epidemiyolojik izleniminin sağlanmasını amaçlamışlardır ve izolatları rastgele 2 primer kullanarak incelemişlerdir (Şener ve ark., 2001). Claeys et al. ise ERIC2 primeri kullanarak AP-PCR analizini gerçekleştirmişlerdir (Claeys et al., 2000). Çalışmamızda ise *P. aeruginosa* izolatları farklı klinik salgılardan izole edilmiş ve M13 primeri kullanılarak AP-PCR analizine alınmıştır. Giardono et al., 3 yıllık bir sürveyans çalışmasında kistik fibrozisli hastalardan izole edilen 42 *P. aeruginosa* suşunun tiplendirilmesi sonucu 11 farklı grup saptamışlar fakat dirençlilik profilleri arasında bir uyum saptayamamışlardır (Giardono et al., 2001).

Karbepenem duyarlı *P. aeruginosa* suşlarının AP-PCR ile tiplendiren Binmet et al., 43 meropenem ve imipenem dirençli suşun antibiyotik duyarlılığı ile moleküler tiplendirilmesi arasında bir korelasyon saptayamamışlar ve bu durumun antibiyotik kullanımı ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Binmet et al., 2008). Çalışmamızda AP-PCR'a göre 4, 10, 13, 15, 16 ve 17. gruplarda bulunan suşlar imipeneme duyarlıdır. Dolayısı ile duyarlı olan suşların antibiyotik kullanımı ile korelasyon gösterdiği bu çalışma ile uyum göstermektedir.

Dünya genelinde *P. aeruginosa* suşlarının genotiplendirilmesinde farklı moleküler tiplendirme metodları kullanılmıştır. Brezilya'da yapılan bir araştırmada *P. aeruginosa* izolatlarının Kuarter amonyum bileşiklerine karşı farklı duyarlılıkları belirlenmiş ve PFGE tiplendirme metodu ile aynı klonal gruba dahil olan izolatların farklı duyarlılıkları gösterebileceği rapor edilmiştir. Yine benzer sonuçlar Seder et al. ve Loneiro ve arkadaşları tarafından da rapor edilmiştir (Maria et al., 2005). Çalışmamızda da benzer şekilde, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 ve 14.'ü AP-PCR gruplarındaki *P. aeruginosa* suşlarının farklı antibiyotik duyarlılık profillerine sahip oldukları belirlenmiştir.

Portekiz'de kistik fibrozis hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşları arasındaki klonal ilişki RAPD yöntemi ile analize alınmış, tekli veya çoklu bant profillerine göre izolatlar iki farklı araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir. Toplam 15 örnekten 5 farklı profil saptanmıştır ve 8 suşun da kolistin hariç tüm antimikrobiyallere dirençli olduğu ve aynı profili gösterdiği rapor edilmiştir (Cardoso et al., 2008).

DNA dizi analizi gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamaktadır (Zülal, 2001). Dizi analizinde homoloji (benzerlik) araştırması, yeni bulunan bir dizinin veritabanında bilinen tüm diğer diziler ile karşılaştırılması ve bunun sonucunda veri tabanında tanımlanmış bazı biyolojik işlevlerin yeni bulunan dizi ile karşılaştırılmasıdır. Bu yöntem ile dizi, benzerlikler ve protein kodlama potansiyeli yönünden araştırılarak genler belirlenir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

MβL'ların tayininde fenotipik testlerin yanı sıra PCR analizi ve sonrasında yapılacak olan sekans analizi ve klonlama kabul edilmektedir (Bush et al., 2005). Son yıllarda kabul gören diğer bir yaklaşım ise *P. aeruginosa* izolatları arasında sınıf 1 integronlara özgü primerler kullanarak integronu belirlemek ve sekans analizi ile integronda bulunan gen kaseti veya gen kasetlerinin içeriğini belirtmektir (Toleman et al., 2005).

Araştırmamızda DNA dizi analizi, Applied Biosystem's Sequencing Analysis Software programı ile gerçekleştirilmiştir. Patzer et al., DNA dizi analizini Lasergene Software programı ile yapmışlardır (Patzer et al., 2004).

Homoloji analizleri sonucu 18-18 VIMF5 ve 16-16 VIMF5 No'lu izolatların Yunanistan'dan izole edilen *Escherichia coli* (*E. coli*) blaVIM geni içeren integron sekansı ile %100 benzerlik gösterdiği, A-17 VIMF5, A-12 VIMF5 ve 1-H IMPF5 No'lu izolatların ise *P. aeruginosa* InABI integronu ile %100 homoloji gösterdiği saptanmıştır.

16-16 VIMF5, 8-B VIMF5 ve 18-18 VIMF5 ve A-6 VIMF5 No'lu izolatların bla_{VIM-4} geni içeren *P. aeruginosa* İntegronu, 8-B No'lu izolatın aynı zamanda *P. aeruginosa*'da taşınan 96 plazmid pOZ176 Transpozon Tn21-benzeri rezolvaz (TnpR) geni ve traspozisyon (tnpM) geni taşıdığı DNA dizi homolojisi analizlerinde doğrulanmıştır.

A-6 VIMF5 No'lu izolatın DDBJ/blast analizi sonucu bla_{VIM} geni taşıdığı halde *E. coli* 1540 p (IP1206)'i ile %94 benzerlik gösterdiği doğrulanmıştır. Bla_{VIM} geni taşıdığı saptanan diğer 3-3 VIMF5 No'lu izolatın ise %87'lik bir oranda *E. coli* plazmidi R124/3 ile homoloji göstermektedir.

Xiong et al., 29 *P. aeruginosa* suşunun 7'sinde bla_{IMP-1} ve bla_{IMP-2} geni saptamışlardır. Bla_{IMP} geni pozitif olarak tanılanan 7 izolatın %82-91 oranında veritabanında diğer bla_{IMP} allelerine benzer olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 96 No'lu izolatın, Sul-1-ilişkili integronun gen kasetinde bulunan bla_{IMP-9} alleleline homolog olduğu belirtilmiştir. Bu integron kaseti ise, aacA4, bla_{IMP-9}, aacA4, catB8 ve bla_{OXA-10} olmak üzere beş gen kasetini içermektedir. Bla_{IMP-9} geninin veritabanında olduğu gibi, diğer 6 bla_{IMP} pozitif izolatları ile homoloji gösterdiği belirtilmiştir (Xiong et al., 2006). Araştırmamızda, A-6 VIMF5, 18-18 VIMF5, 16-16 VIMF-5, 8-B VIMF5 No'lu izolatlarının homoloji araştırmaları sonucu, bla_{VIM-4} geni içeren *P. aeruginosa* sınıf 1 integronuna %100 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca sınıf 1 integronun bla_{VIM-4} geni dışında aacA4, aphA15, aadA1 ve qacEdelta1 dört gen kaseti daha içerdiği belirtilmiştir. Patzer et al., GenBank/FASTA veritabanında yapmış oldukları araştırmaya göre Polonya'dan izole ettikleri bla_{VIM} geni taşıyan bir suşun, Yunanistan'da izole edilen *E. coli*'nin bla_{VIM-1} geni içeren sınıf

1 integronuna %100 homoloji gösterdiğini belirtmişlerdir (Patzner et al., 2004). Araştırmamızda da, 18-18 VIMF5 ve 16-16VIMF5 No'lu izolatların Yunanistan'da ve Polonya'da izole edilen *E. coli*'nin sınıf 1 integronuna %100 benzerlik gösterdiği BLAST analizleri sonucu saptanmıştır. *E. coli* sınıf 1 integronu bla_{VIM-1} geni dışında 6'-N-aminoglikozid, asetiltransferaz, kuarterner amonyum dirençlilik geni ve Sulfonomid dirençlilik gen kaseti (Sul I) de içermektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarına ve diğer literatürlerin verilerine göre Dünya genelinde klinik örneklerden *P. aeruginosa* izolasyonunun giderek artan bir trend izlediği, son zamanlarda daha çok servisten daha yüksek bir oranda izolasyon yapıldığı görülmektedir. Dolayısı ile *P. aeruginosa* enfeksiyonların hastanelerin çeşitli servislerinde zaman içinde daha çok yaygınlaştığını ve izolasyon oranının da gittikçe arttığını söylemek mümkündür. *P. aeruginosa*'nın klinik materyallerden artan izolasyon sıklığıyla birlikte antibiyotik direnç profillerinin de değiştiği görülmektedir. Hastane izolatları arasında giderek daha yüksek oranda dirençli suşların izole edilmesi ve çoklu ilaç direncinin izolatlar arasında artış göstermesi, hastane kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının takip edilmesini gerektirmektedir. Bu sayede uygun tedavinin uygulanması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ağuş, N., Yılmaz, N., Bozcal, E., 2008,** Prevalence of Metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to imipenem, BP-160, IUMS.
- Akçam, F., Gönen, İ., Kaya, O., Yaylı, G., 2004,** Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli gram-negatif bakterilerde Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması, *Klinik Dergisi*, Cilt 17, Sayı:1, s: 47-49.
- Akova, M., 2004,** Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Var!, *Ankem Dergisi*; 18 (Ek 2): 98-103.
- Altoparlak, U., Aktaş, F., Celebi, D., Ozturk, Z., Akcay, MN., 2005,** Prevalence of Metallo-Beta-Lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these Isolates, PMID: 16129224 (Pubmed), 31:707-10.
- Amer, A., El-Behedy, E., Mohtady, H., Zanfaly, H., Soud, D., Behedy, T., Gendy, E., 2007,** Imipenem resistance and presence of BLA_{IMP} gene among hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* at University Hospital in Egypt, *J Infect Developing Countries*; 1(1): 42-47.

KAYNAKLAR (devam)

- Arakawa ,Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., Goto, M., 2000,** Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-producing gram-negative bacteria by Using Thiol compounds, *Journal of Clinical Microbiology*, Vo.38, No.1, p.40-43.
- Avcı, M., Özgenç, O., Çoşkuner, A., Mermut, G., Arı, A., 2007,** Yoğun bakım ünitesinde hastane enfeksiyonu etkenleri ve en sık soyutlanan mikroorganizmalarda yıllara göre değişen antibiyotik direnç profili, *ANKEM derg.*; 21(3): 179-183.
- Aşık, 2006,** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* klinik izolatlarında Metallo- β -Laktamaz üretiminin araştırılması, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Koncan, R., Fontana, R., Rossolini, G., Cornaglia, G., 2004,** Detection of VIM-5 metallo- β -Lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, DOI: 1093/Jac/dkh321.
- Bilgehan, H., 1972,** Klinik mikrobiyoloji; Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, İzmir.

KAYNAKLAR (devam)

- Bush, K., Jacopy, G., Medeiros, A., 1995,** A functional classification scheme for Beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrobial Agents and Chemothepraphy*, Vol.39, No.6:1211-1233.
- Cardoso, O., Alves, A., Leitao, R., 2008,** Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient, *International Journal of Antimicrobial Agents*, p. 375-379.
- Çakar, A., 2005,** Hacettepe Üniversitesi Hastanesi’de ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi.
- Çelik, N., 2007,** Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta-laktamazların fenotipik ve genetik olarak incelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyolojik ve Klinik Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi.
- Çetinel Aksoy, S., 2008,** Süt dişi kanallarından *Enterococcus Faecalis* izolasyonu, kültürel ve moleküler yöntemler ile tanılanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinin saptanması, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

KAYNAKLAR (devam)

- Durmaz, R., 2000,** Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri.
- Ersöz, G., Otağ, F., Bayındır, İ., Kandemir, Ö., 2004,** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değeri, *ANKEM Derg.*, 18 (1): 28-31
- Fidan, I., Gürelık, F., Yüksel, S., Sultan, N., 2005,** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve Metallo- β -Laktamaz sıklığı, *Ankem Derg.*, 19 (2):68-70.
- Fisher , J., O. Meroueh, S., mobashery, S., 2005,** Bacterial resistance to Beta-Lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity, *Chem. Rev.* 105, p. 395-424
- Fluit, AD:, Visser, R., Schmitz, F., 2001,** Molecular detection of antimicrobial resistance, *Clinical Microbiology Reviews.* Vol.4, No.4, p. 836-871.
- Gibb, A., Trinbuddharat, C., A. Moore, R., J.Loie, T., Krulicki, W., Livermore, D., Palepou, M., Woodford, N., 2002,** Nosocomial Outbreak of Carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla_{IMP} allele, bla_{IMP-7}, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 46, No. 1, p. 255-258.

KAYNAKLAR (devam)

- Goldstein, F.W., Ly, A., Kitzis M.D., 2007,** Comparison of Etest with agar dilution for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other Multidrug-resistance Bacteria to Colistin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi: 10.1093/jac/dkm046.
- Gültekin, B., Eyigör, M., Aydın, N., 2004,** Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci, *ANKEM Derg.*, 18 (1):1-4.
- Gülay, Z., 2002,** Antibiyotik duyarlılık testlerinin Yorumu, *Toraks Dergisi*, 3(1): p.75-88.
- Hawkey, P.M., 2008,** The growing burden of antimicrobial resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, Suppl, 1, il- i9.
- Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Nakano, M., Izumikawa, K., 2003,** Clinical and bacteriological Characteristics of IMP-type Metallo- β -Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*, *CID*. 37, 26:32.
- Kasloff, S., 2008,** *Pseudomonas aeruginosa* –Intraspecies Cooperation & Intraspecies Competition, Microbial Pathogenesis

KAYNAKLAR (devam)

- Kocabeyoğlu, Ö., Sonuvar, S., Emekdaş, G., Kerse., M., 1990,** Bazı antibiyotik kombinasyonlarının stafilokok Suşları üzerine etkilerinin in-vitro olarak araştırılması, *Ankem Derg.* 4(2): 236.
- Koh, T., Wang, C., Sng, L., 2004,** Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two Hospitals in Singapore, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No.11, p.5378-5380.
- Lee, K., Lee, W., Uh, Y., Ha, G., Cho, J., Chong, Y., 2003,** VIM-and IMP- Type Metallo- β -Lactamase- producing *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* in Korean Hospitals, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9. No. 7.
- Lee, Y., Ahn, B., Jin, J., Kim, J., Lee, S., Song, D., Lee, W., Lee, C., 2007,** Molecular caharacterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents, but susceptible to colistin , in Daegu, Korea, *The Journal of Microbiology*, Vol. 45, No.4, p. 358-363.
- Libisch, B., Watine , J., Balogh, B., Gacs, M., Muzslay, M., Szabo, G., Füzi, M., 2008,** Molecular typing indicates n important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary, *Research in Microbiology*, p. 162-168.

KAYNAKLAR (devam)

- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pederson, J., 2000**, Rapid mini-preparation of Fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38, No.1, p.471.
- Livermore , D., 1995**, β - Lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, vol.8, No.4, 557-584.
- Loans, K., Villages, M., P.Quinn, J., 2007**, *Pseudomonas aeruginosa* : An understanding of Reistance Issues.Antimicrobial Resistance Problem Pathogens and Clinical Countermeasures, Informa Healthcare Press, p.149-182.
- Macneil, D.J. 2002**, A flexible boiling procedure for isolating plasmid DNA from gram positive microorganisms, *Microbial Genetics*, Merck Sharp and Dohme Research Laboratories.
- Maria, C., Romao, C., Faria, Y., Pereira, L.R., Asensi, M., 2005**, susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital didsnfectant and molecular typing, *Mem. Ins Oswaldo Cruz*, Rio de Jenerio, vol. 100(5): p.541-548.
- Nikbin, V.S., Abdi-Ali, A., Feizabadi, M.M., Gharavi, S., 2007**, Pulsed Field Gel Electrophoresis & plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran, *Indian J. Med. Res.* 126, p. 146-151.

KAYNAKLAR (devam)

- Ohara, M., Kouda, S., Onodera, M., Yoshihiro, F., Sasaki, M., Kohara, T., Kashiya, S., Hayashida, S., Kadono, M., Komatsuzawa, H., Gotoh, N., Usui, T., Hideyuki, I., Kuwabara, T., Yokoyama, T., Sugai, M., 2007,** Molecular Characterization of Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan, *Microbiol. Immunol.*, 51 (3), p. 271-277.
- Ozgumus, OB., Ceylan, R., Tosun, I., Sandalli, C., Aydın, K., Koksall, I., 2007,** Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates Carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey, *Microb Drug Resist.* 13 (3): 191-8.
- Özgenç, O., Urbarlı, A., Erdenizmenli, M., Fidan, N., Arı, A., 2002,** *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması, *Infeksiyon Dergisi*, 6 (2), : 179-182.
- Özkalay, N., Ağuş, N., Cengiz, A., Taneri, N., 2006,** *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılığındaki değişim, *ANKEM Derg.*, 20(3), p. 159- 163.

KAYNAKLAR (devam)

- Patzer, J., Toleman, A., Deshpande, L.M., Kaminska, W., Dzierzanowska, D., Bennet, P., Jones, R., Walsh, T., 2004,** *Pseudomonas aeruginosa* strains harboring an unusual bla VIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 451-456.
- Pitout, J., Gregson D., Poirel, L., McClure, J., Le, P., Churh, D., 2005,** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.43, No.7, p. 3129-3135.
- Pitout, J., Chow, B., gregson, D., Laupland, K., Elsayed, S., Church, D., 2007,** Molecular epidemiology of Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2-producing Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, No.2, p. 294-298.
- Pitout, J., Revathi, G., Chow, B., Kabera, B., Kariuki, S., Nordmann, P., Poirel, L., 2008,** Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya, *Clin. Microbiol. Infect.* 14: p. 755-759.

KAYNAKLAR (devam)

- Plesiat, P., Alkhalaf, B., Michel-Briand, Y., 1988,** Prevalence and profiles of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 7, No.2, p. 261-264.
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J., Nordman, P., 2000,** Caharacterization of VIM-2, a carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron born gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, No. 4, p. 891-897.
- Pournaras, S., Maniati, M., Petinaki, E., Tzouvelekis, L.S., Tsakkaris, A., Legakis, N.J., Maniatis A.N, 2003,** Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- β -lactamase gene variants bla_{VIM-2} and bla_{VIM-4}, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, p.1409-1414.
- Pullukçu, H., Işıkgöz, M., Aydemir, Ş., Sipahi, O., Turhan, A., Özinel, M., Ulusoy, S., 2006,** İdrar kültürlerinden soyutlanan bakteriler ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi, *Ankem Derg.*, 20(1), p. 26-30.
- Oueenan M., Bush, K., 2007,** Carbepenemases: Versalite β -Lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 20, No. 3, p. 440-458.

KAYNAKLAR (devam)

- Sacha, P., Wiecezorek, P., Hauschild, T., Zorawski, M., Olszanska, D., Tryniszewska, E., 2008,** Metallo- β -Lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*- a novel mechanism resistance to β -Lactam antibiotics, *Folia Histochemica Et. Cytobiologica*, vol. 46, No. 2, p. 137-142.
- Sarı, H., 2005,** Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/ meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta-laktamaz varlığının (MBL) araştırılması, istanbul, Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996,** PCR Detection of Metallo- β -Lactamase Gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative Rods resistant to broad-spectrum β -Lactams, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, No.12, p. 2909-2913.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996,** Multifocal Outbreaks of Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -Lactams, Including carbapenems, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 40, No. 2, p. 349-353.

KAYNAKLAR (devam)

- Sesli Çetin, E., Kaya, S., Taş, T., Cicioğlu, B., Demirci, M., 2006,** Cerrahi alan infeksiyonlarında mikroorganizma profili ve antibiyotik duyarlılık durumu. *Ankem Derg.*, 20(2).: p. 89-93.
- Spencker, F.B., Staber, L., Lietz, T., Schille, R., Rodloff, A.C., 2003,** Development resistance in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients with cystic fibrosis at different times, *Clin. Microbiol. Infect.* 9: p. 370-379.
- Strateva, T., Ouzounova-Raykova, V., Marova, B., Todorova, A., Marteva, Y., Mitov, I., 2007,** Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanism, *Journal of Medical Microbiology*, 56, p. 956-963.
- Toraman, Z., Yakupoğulları, Y., Kizirgil, A., 2005,** Pseudomonas ve Acinetobacter şuşlarında Metallo-Beta-laktamaz araştırılması, *Infeksiyon Dergisi*, 19 (1): 101-105.
- Toleman, A.M., Biedenbach, D., Bennet, D., Jones, R., Walsh, T., 2005,** Italian metallo- β -lactamases: A national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, p. 61-70.

KAYNAKLAR (devam)

- Uzel, A., 2002,** İzmir ilindeki çeşitli trustik tesislerden *Legionella pneumophila* serogrup 1'in konvensiyonel ve moleküler biyolojik yöntemler ile izolasyonu ve identifikasyonu. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Varaiya, A., Kulkarni, N., Kulkarni, M., Bhalekar, P., & Dogra, J., 2008,** Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients, *Indian J. Med. Res.* p. 398-402.
- Vedel, G., 2005,** Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, p. 657-664.
- Walsh, T., Toleman M., Poirel, L., Nordman, P., 2005,** Metallo- β -Lactamases: The quiet before the storm, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 18, No.2, p. 306-325.
- Xiong, J., Hyres, M., Ye, H., Chen, H., Yang, Y., Zali, F., Hawkey, F., 2006,** bla_{IMP-9} and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50, No.1, p. 355-358.

KAYNAKLAR (devam)

- Xu, J., Moore, J., Murphy, P., Millar, B., Elborn, S., 2004,** Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*-comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF), *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3:21.
- Yakupoğulları, Y., Poirel, L., Bernabeu, S., Kizirgil, A., 2007,** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum β -lactamase PER-1 and metallo- β -lactamase VIM-2 from Turkey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi: 10. 1093/Jac/dkm420.
- Yong, D., Lee, K., Yum, J., Shin, H., Rossolini, G., Chong Y., 2002,** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter sp.*, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No.10, p. 3798-3801.
- Yordangil, B., 1999,** Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 6 (2).
- Yücel, M., Yavuz, T., Kaya, D., Öztürk, C., Şahin, İ., 2006,** *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi, *ANKEM Derg.*, 20 (3), p.152-155.

KAYNAKLAR (devam)

Zavascki, A., Barth, A., Gonçalves, S., Moro, A., Fernandes, J., Martins, A., Ramos, F., Goldani, L.Z., 2006, The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, p. 387-392.

Zavascki, A., Barth, A., Gonçalves, S., Moro, A., Fernandes, J., Martins, A., Ramos, F., Goldani, L.Z., 2006, Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study, *Critical Care*, 10: R114.

Zülal, A., 2001, İnsan genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, tübitak Yayınları, p. 5-11.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html>)

ÖZGEÇMİŞ

20 Temmuz 1985 yılında Afyon’da doğan Elif BOZÇAL, ilk öğrenimini 100.Yıl İlk Öğretim Okulu’nda tamamlamış, 1999 yılında Talatpaşa İlköğretim Okulu’nda Orta eğitimini bitirmiştir. Lise eğitimini İzmir, Emlakbank Süleyman Demirel Lisesi’inde 2002 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl girdiği Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun olmuştur. 2007 yılında, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

“Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Metallo- β -Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemler ile Saptanması” adlı yüksek lisans tezi hazırlamıştır.