

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ÇOĞUL DİRENÇLİ NOZOKOMİYAL PSEUDOMONAS
AERUGINOSA SUŞLARINDA BETA LAKTAMAZLARIN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ**

NİGAR ÇELİK

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÇİĞDEM BAL**

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.






21 / 03 / 2007

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Tez Sahibi : Nigar Çelik
Tez Başlığı : Çoğul Dirençli Nozokomiyal Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Beta Laktamazların Fenotipik Ve Genotipik Olarak İncelenmesi
Sınav Yeri : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Sınav Tarihi : 21 / 03 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|
| 1.Prof.Dr Emel Bozkaya |  | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD |
| 2.Prof.Dr Güner Söyletir |  | Marmara Üniv. Tıp Fakültesi Mikr.AD. |
| 3.Prof.Dr Çiğdem Bal (danışman) |  | İstanbul TıpFak. Mikrobiyoloji AD |
| 4.Prof.Dr Bülent Gürler |  | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |
| 5.Prof Dr Mine Küçüker |  | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nigar Çelik



İTHAF

Beni her zaman sevgi ve özveriyle destekleyen aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince benden destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli Sayın Hocam Prof. Dr. Çiğdem Bal'a,

Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Bülent Gürler'e,

Bana Doktora yapma olanağı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Emel Bozkaya'ya,

Değerli bilgileriyle beni yönlendiren ve her zaman destekleyen Sayın Hocam Dr. Şükûfe Diren'e ve Sayın Hocam Prof. Dr. Yıldız Camcıoğlu'na,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum Sayın Hocam Bakteriyoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nezahat Gürler'e ve Sayın Hocalarım Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Prof. Dr. Betigül Öngen ve Prof. Dr. Derya Aydın'a,

Bilgi ve deneyimlerinden her fırsatta yararlanmamı sağlayan ve tez çalışmam süresince büyük ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Dr. Zerrin Aktaş'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana içtenlikle yardımcı olan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanları Semra Terzi, Aysel Hendekçi, Tenzile Tuncer ve Salih Sevincik'e teşekkür ederim

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-639/17032005 nolu proje olarak desteklemiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mikroskopik Özellikler	2
2.2. Kültür Özellikleri	2
2.3. Biyokimyasal Özellikler	3
2.4. Virulans Faktörleri	3
2.5. <i>P.aeruginosa</i> Enfeksiyonları.....	5
2.5.1. Biyofilm Enfeksiyonları ve Kistik Fibroz.....	5
2.5.2. Diğer Enfeksiyonlar	7
2.6. <i>P.aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	9
2.7. <i>P.aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Direnci.....	10
2.7.1. Beta Laktamaz Enzimleri.....	10
2.7.1.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL).....	14
2.7.1.2 Metalo Beta Laktamazlar (MBL).....	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri	21
3.1.1. Disk Difüzyon Yöntemi	21
3.1.2. Agarda Dilüsyon Yöntemi	22
3.2. Çift Disk Sinerji Yöntemiyle GSBL Saptanması.....	23
3.2.1. GES tipi GSBL Varlığının Saptanması.....	23

3.3. Kromozomal İndüklenebilir Beta Laktamaz (İBL) Varlığının Araştırılması	24
3.5. MBL Varlığının Araştırılması.....	24
3.5.1. E-test	24
3.5.2. 0,1 ve 0,5 M EDTA ile çift disk sinerji ve kombine disk testleri	24
3.6. İzoelektrik Nokta Tayini (Isoelectric Focusing, IEF)	25
3.7. Bioassay ile Karbapenemaz Varlığının Saptanması	27
3.8. Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle İncelenmesi	28
4.BULGULAR.....	33
5.TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Beta laktamazlar için Bush sınıflaması	12
Tablo 2-1: GES türevi enzimlerin aminoasit değişiklikleri ve bununla ilgili hidroliz profilleri	18
Tablo 3-1: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların bilinen pI değerleri.....	26
Tablo 4-1: Agarda dilüsyon deneyi sonucunda elde edilen MİK değerleri	33
Tablo 4-2: Agarda dilüsyon deneyi sonuçlarına göre MİK değerlerinin kümülatif dağılımı	34
Tablo 4-3: RAPD-PCR profillerine göre suşların dağılımı	38
Tablo 4-4: <i>P.aeruginosa</i> suşlarına ait fenotipik ve genotipik sonuçlar	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: Metal beta laktamaz enzimlerinin saptanması için imipenem ve EDTA disklerinin yerleşimi.....	25
Şekil 4-1: Çift disk sinerji yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) pozitifliği.....	34
Şekil 4-2: İndüklenebilir kromozomal AmpC enzimi (İBL) pozitifliği	34
Şekil 4 -3: GES tipi enzimler için modifiye edilmiş çift disk sinerji testinde pozitif sinerji.....	35
Şekil 4- 4: İmipenem/imipenem+EDTA'lı E-test ile MBL pozitifliği.....	35
Şekil 4-5: EDTA ile MBL pozitifliği.....	36
Şekil 4-6: İzoelektrik nokta tayini (IEF) yöntemiyle görüntülenen beta laktamaz enzim bantları	36
Şekil 4 -7: Karbapenemaz araştırması için bioassay deneyi.....	37
Şekil 4-8: PCR deneyleri sonucunda görüntülenen bantlar	38
Şekil 5-1: Dünyada GSBL enzimlerinin dağılımı	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EDTA:	Etile diamin tetraasetik asit
GSBL:	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
IEF:	İzoelektrik nokta tayini
İBL:	İndüklenebilir beta laktamaz
MBL:	Metalo beta laktamaz
MHA:	Mueller Hinton agar
MHB:	Mueller Hinton buyyon
MİK:	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
pI:	İzoelektrik nokta
TSA:	Triptik soy agar

ÖZET

Çelik N. (2007). Çoğul Dirençli Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Beta Laktamazların Fenotipik ve Genotipik Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : *Pseudomonas aeruginosa*, çoğul direnç, beta laktamaz.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-639/17032005 no'lu proje olarak desteklemiştir.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesinde yatan 24'ü çocuk, 26'sı erişkin 50 hastadan izole edilmiş olan çoğul dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta laktamaz enzimleri araştırılmıştır.

Suşların duyarlılıkları disk difüzyon ve agarda dilüsyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Çift disk sinerji yöntemiyle dokuz (%18) suшта genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığı saptanırken, 16 (%32) suшта indüklenebilir beta laktamaz varlığı pozitif bulunmuştur. Beta laktamazların pI değerleri izoelektrik nokta tayini yöntemiyle 4.5 ve 8.2 arasında bulunmuştur. Kloksasilinli besiyeri ile dört (%8) suшта GES türevi GSBL enzimleri saptanmıştır. Bioassay yöntemi ile yalnız 10 (%20) suшта karbapenem hidrolize eden enzim varlığı saptanırken, E-test ile 14 (%28) suшта metalo beta laktamaz (MBL) bulunmuştur. 0,5 M EDTA ile yapılan çift disk sinerji testinde 12 (%24) ve kombine disk testinde 26 (%52); 0,1 M EDTA ile yapılan çift disk sinerji testinde iki (%4) ve kombine disk testinde bir (%2) suş MBL pozitif olarak bulunmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 22 (%44) suшта PER-1 enzimi, 43 (%86) suшта GES/IBC türevi, 23 (%46) suшта OXA-10 türevi ve 14 (%28) suшта OXA-2 türevi enzimler pozitif olarak saptanırken; TEM, SHV, VEB, IMP, VIM, SPM türevi enzimler negatif bulunmuştur.

Sonuç olarak GSBL oranı %96 olarak bulunmuştur. Bunların %86'sı Türkiye'de ilk kez bu çalışmada araştırılmış olan GES/IBC genlerini içermektedir. EDTA ile fenotipik olarak MBL pozitifliği saptanan suşlardan hiçbiri PCR ile doğrulanmamıştır.

ABSTRACT

Çelik N. (2007) The Phenotypic and Genotypic Study of Beta Lactamases in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Multiple Resistance. Istanbul University. Institute of Health Sciences, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, multiple resistance, beta lactamases.

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-639/17032005.

Beta lactamase enzymes in 50 multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 24 pediatric and 26 adult patients hospitalized in Istanbul University Cerrahpaşa Faculty of Medicine were investigated.

Susceptibilities of the strains were tested with disk diffusion and agar dilution methods. Nine (%18) strains were positive for extended spectrum beta lactamases (ESBL) with double disk synergy test, while 16 (%32) strains showed inducible beta lactamases with the disk induction method. pI ranges of the beta lactamases were between 4.5 and 8.2 by isoelectric focussing. Using cloxacillin-containing media, GES-like ESBLs were determined phenotypically in four (%8) strains. Bioassay method conferred 10 (%20) strains to produce carbapenem hydrolising enzymes while E-test found 14 (%28) strains positive only for metallo beta lactamases (MBL). Using 0,5 M EDTA and imipenem, double disk synergy test showed 12 (%24) and the combined disk test 26 (%52) strains as MBL producers. Double disk synergy and combined disk tests with 0,1 M EDTA found 2 (%4) and 1 (%2) MBL-positive isolates. TEM, SHV, VEB, IMP, VIM, and SPM enzymes were all found negative by polimerase chain reaction (PCR), although PER-1 enzyme was positive in 22 (%44), GES/IBC derivatives in 43 (%86), OXA-10 derivatives in 23 (%46) and OXA-2 derivatives in 14 (%28) strains.

As a whole, the ESBL rate was 96%. Of these, 86% harboured the GES/IBC genes, which were investigated for the first time in Turkey in this study. None of the positive MBL findings in the EDTA-using phenotypical tests were verified by PCR.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez 1882'de tanımlanan *Pseudomonas aeruginosa* doğada yaygın olarak bulunan, insan ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde hastalık yapmadan bulunabilen, öte yandan en önemli nozokomiyal patojenler arasında ilk sıralarda yer alan bir gram negatif çomak türüdür (1,2).

Normalde sağlıklı kişilerin florasında bulunan ve bu kişilerde nadiren hastalık oluşturan *P.aeruginosa* kistik fibrozlu hastaların solunum yollarında, nötropeni, yanık ve AIDS gibi olgularda, prematüre bebeklerde ve yatan hastalarda sıklıkla enfeksiyona neden olan önemli bir fırsatçı patojendir (2,3).

Nemli ortamlarda kolay ürediği için hastanelerde solunum destek sistemleri, temizleme solüsyonları, dezenfektan maddeler ve hasta atıkları, endemik *P.aeruginosa* enfeksiyonu için potansiyel kaynak olabilmektedir. Antibiyotiklere kolay direnç geliştirme ve çok farklı direnç mekanizmalarını aynı suшта bulundurabilme özelliği *P.aeruginosa*'nın klinik önemini daha da artırmaktadır (1,2,3).

Bu çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesinde yatan 24'ü çocuk, 26'sı erişkin olmak üzere 50 farklı hastanın çeşitli örneklerinden izole edilmiş olan ve en az üç antibiyotik grubuna dirençli olduğu için "çoğul dirençli" olarak tanımlanan *P.aeruginosa* suşlarında beta laktamaz enzimlerinin fenotipik ve genotipik olarak saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Daha önceki tarihlerde yaralarda, özellikle de ameliyat yaralarında mavi-yeşil renkli cerahat etkeni olarak göze çarpan *Pseudomonas aeruginosa* 1882'de Gessard tarafından tanımlanmıştır (1,2).

Doğada yaygın olarak bulunan; suda, toprakta, bitkilerde, böceklerde, balıklarda, amfibialarda, kuşlarda ve ayrıca insan ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde hastalık yapmaksızın bulunabilen *P.aeruginosa*, Pseudomonadaceae ailesi içindeki *Pseudomonas* cinsinin en önemli nozokomiyal patojeni ve en iyi tanımlanmış türüdür (1-5).

Distile suda bile çoğalabilecek kadar minimal besin maddesine ihtiyaç göstermesi, sıcaklık dahil, farklı fiziksel şartlara uyum göstermesi fırsatçı patojen olarak önemli rol oynamasına yardımcı olur (6). *P.aeruginosa* suşları dezenfektan ve sıvı sabunlar, temizlik sıvıları, hasta odalarındaki çiçekler gibi birçok ortamdan izole edilmişlerdir (2,5).

2.1. Mikroskopik Özellikler

Değişiklik göstermekle birlikte *P.aeruginosa* yaklaşık olarak 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, gram negatif çomaktır. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır. Bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiği vardır ve bu nedenle çok hareketlidir (1,2).

2.2. Kültür Özellikleri

P.aeruginosa aerop üreme özelliği gösterir. Üreyebilmek için oksijene ihtiyaç duyduğundan sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde ürer ve zarın hemen altında mavi-yeşil pigmenti ayırt edilebilir. Laboratuvarlarda triptik soy agar, koyun kanlı agar, çukolata agar, Mueller Hinton agar (MHA), endo ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasında önemlidir (1,2,5,6).

P.aeruginosa kanlı jelozda beta hemoliz yapar. Kolonileri genellikle 3-5 mm büyüklüğünde, kenarları düzensiz ve üzeri düzgün görünümündedir. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen ve aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) oluşturan suşları ise mukoid tiptedir (1,2,5).

2.3. Biyokimyasal Özellikler

P.aeruginosa oksidaz pozitif olması ve glikozu fermente etmemesi ile Enterobacteriaceae'den ayrılır. Laktoz ve sakkarozu etkisizdir. Katalaz ve l-arginin dihidrolaz oluşturur; lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmaz; indol ve H₂S üretmez. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatiftir; potasyum siyanüre dirençlidir; nitratı nitrite çevirir. Hem organizmada, hem de kültür ortamında hidrosiyanik asit yapma özelliğine sahiptir. *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* aynı bakterilerin diğer kökenlerine etki ederek onları eriten bakteriyosinler yaparlar. Bakteriyosin tiplendirmesi, *P.aeruginosa* kaynaklı hastane enfeksiyonu salgınlarında epidemiyolojik takip için kullanılan yöntemlerden biridir (1,2,5,6).

2.4. Virulans Faktörleri

P.aeruginosa'nın pigment, hemolizinler, ekzotoksin A, ekzoenzim S, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adhezinleri ve aljinat gibi virulans faktörleri vardır. Bunlar bakterinin konağa yerleşmesine ve konağa ait hücreleri hasara uğratmasına yardımcı olurlar (7).

Pigment oluşumu: *P.aeruginosa* kökenlerinin büyük çoğunluğu bir yada daha fazla sayıda pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, turkuaz mavisi renkli piyosiyenin pigmentidir. Bu özellik *P.aeruginosa*'nın tanısı için önemlidir. Her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamışsa da, diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları saptanmıştır. Ayrıca piyosiyenin pigmenti bakteri hücrelerinin demir alımında da rol oynamaktadırlar (2,7,8). Bazı *P.aeruginosa* suşlarının ise sarı renkli piyoverdin, kırmızı renkli piyorubin veya kahverengi piyomelanin pigmenti yaptıkları saptanmıştır. Bu suşlar besiyerlerinde sarı-yeşil, mavi-yeşil, kırmızı, mor ya da kahverengi üremeleriyle özellik kazanırlar. Bakteriler tarafından hücre dışına salınan bu pigmentler, oksijensiz koşullarda görülmezler fakat oda ısısında daha belirginleşirler (1,2,6).

Hemolizinler (ramnolipid ve fosfolipaz C): *P.aeruginosa*'nın hemolitik aktivite gösteren bileşiklerinden biri glikolipid yapısında olan ramnolipiddir. Isıya dayanıklı olan ramnolipid, ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten ibarettir. Bu molekül deterjan benzeri bir etki göstermektedir. Fosfolipaz C ile birlikte fosfolipidler üzerinde oluşturduğu çözücü etki ile akciğer yüzey gerilimini inaktive etmektedir. Ayrıca silli

trakea hücreleri üzerindeki etkisiyle siliyostaza neden olmaktadır. Ramnolipidin bir diğer etkisi monositlerden oksijen radikalının jenarasyonunu artırarak *P.aeruginosa* ile enfekte kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde doku hasarına neden olmasıdır (2,9).

P.aeruginosa'nın hemolitik aktivite gösteren bir diğer bileşiği fosfolipaz C'dir. Isıya duyarlı olan fosfolipaz C, lesitinden fosforilkolini ayıran bir lesitinazdır. Fosfolipaz C'nin kistik fibrozlu hastalarda solunum yollarının kolonizasyonunda önemli bir rol oynadığı saptanmıştır. Kan kültüründen izole edilen suşların, diğer kültürlerden izole edilen suşlardan daha fazla fosfolipaz C ürettikleri saptanmıştır (2,9,10).

Ekzotoksin A: Ekzotoksin A'nın monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırması bu bakteri ile enfekte hastalarda oluşan kronik akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır. Ekzotoksin A kornea, yanık, yara ve akciğer enfeksiyonlarında önemli bir virulans faktörüdür. Ekzotoksin A difteri toksini ile aynı intrasellüler etki mekanizmasına sahip olmasına rağmen, neden olduğu enfeksiyon tipi farklılık göstermektedir. Bunun nedeni ekzotoksin A'nın, difteri toksininde görüldüğü gibi kana karışarak vücudun diğer bölümlerine yayılmayıp, yerel etki göstermesidir. Bir diğer neden ise bakterinin oluşturduğu ekzotoksin A miktarının suşa bağlı olarak değişmesidir. Kronik akciğer enfeksiyonlarında bakterinin nonmukoid fenotipinin mukoid şekle dönüşmesi sonucu kandaki ekzotoksin A'nın miktarı geriye dönüşümlü olarak belirgin bir şekilde azalmaktadır (2,11-14).

Ekzoenzim S: Ekzoenzim S ökaryotik hücrelerde bulunan bir veya birden fazla proteini modifiye etmektedir. Sadece ekzotoksin A veya ekzoenzim S oluşturan suşlara göre, her ikisini de oluşturan suşlarla enfekte olan hastalarda mortalite oranı daha yüksektir. Ekzoenzim S oluşturan suşlarla daha yüksek mortalitenin görülmesi, bu enzimin *P.aeruginosa*'nın etken olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarında gözlenen progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını göstermektedir (2,15,16).

Proteazlar (alkali proteaz ve elastaz): Alkali proteaz ve elastaz *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan en önemli virulans faktörleri arasındadır. Jelatini, kazeini, laminini ve immüoglobulinleri parçalarlar. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır. Proteazlar *P.aeruginosa* ile kronik olarak enfekte kistik fibrozlu hastaların tükürüğünde saptanan konsantrasyonlarda, insan periferik kan nötrofillerinin kemotaksisini inhibe ederler. Bu da *P.aeruginosa*'nın konağın ilk savunma hattından kaçışında önemlidir. Bu kaçış

mekanizması bakterinin üremesine, çoğalmasına ve sonuçta kolonizasyon oluşturmaya neden olmaktadır (12, 17-19).

Yüzey adhezinleri: *P.aeruginosa*'nın yüzeyinde iki adhezin bulunmaktadır. Bunlardan biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarittir. Piliye 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 aracılığıyla yanak epitel yüzeyindeki belirli reseptörleri tanınması ve yapışmasıyla başlamaktadır. *P.aeruginosa* kistik fibrozlu hastaların yanak epiteline normal kişilerinkinden daha iyi tutunabilmektedir. Hastaların tükürüğünde bulunan proteazlar hücre yüzeyinden fibronektini ayırmakta ve bu şekilde pilinin tanıdığı yanak epitel hücreleri ve trakeal epitel hücre yüzeyindeki reseptörler açığa çıkmaktadır. *P.aeruginosa*'nın mukoid suşları hasar görmemiş normal trakeal epitel hücrelerine nonmukoid suşlardan daha fazla miktarda tutunabilmektedir. Piliye bağlı tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önem kazanırken, aljinata bağlı tutunma, mukosilyer atılımın hasar gördüğü durumlarda, alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk basamağı oluşturmaktadır. Ancak burada epitel hücrelerinde belirgin bir hasar gerekmemektedir (2,20,21).

Aljinat (Mukoid Ekzopolisakkarit): *P.aeruginosa*'nın aljinatı anyonik bir polisakkarittir ve antifagositik etki oluşturan bir yapıya sahiptir. Bu etki nötrofillerin kemotaksisini inhibe etmesi, komplemanı alternatif yoldan aktive etmesi ve bakteriyeye karşı zayıf opsoninlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır. (22).

2.5. *P.aeruginosa* Enfeksiyonları

2.5.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Kistik fibroz olgularında görülen morbidite ve mortalitenin en başta gelen nedeni kronik bronkopulmoner kolonizasyon ve enfeksiyondur. Kistik fibroz olgularında gelişen bu enfeksiyonların patogenezinde yatan temel neden, kistik fibroz transmembran regülatör geninde saptanan defektlere bağlı olarak gelişen ve epitel düzeyinde anormal klor iyonu transferi şeklinde eksprese olan bir metabolik bozukluktur (23).

Solunum yollarının ilk kolonizasyonu nonmukoid *Pseudomonas* suşlarıyla olmakla birlikte, bazı çevresel koşulların baskısı altında bu suşlar mukoid fenotipe dönüşerek akciğer enfeksiyonlarında dominant hale geçmektedirler. Nonmukoid suşun

mukoid şekle dönüşebilmesi için bakteride mukoid ekzopolisakkarid yani aljinat sentezinin uyarılması gerekmektedir. *P.aeruginosa*'nın aljinatı anyonik bir polisakkarid olup asidik şekerler olan beta-D-mannuronik ve alfa-L-gluronik asidin gelişigüzel dizilmesiyle oluşan bir polimerdir. Mukoid *P.aeruginosa* suşları nonmukoid suşlarda bulunan poli-G bloklarından yoksundurlar ve bu durum da bakterinin mikrokoloniler halinde üremesine imkan vererek etrafını saran geniş hacimli elastik bir matriksin oluşmasını sağlamaktadır (2,24,25).

P.aeruginosa'nın mukoid suşları kistik fibrozlu hastalarda bir yaşın altında %21 oranında, 26 yaşın üzerinde ise %80'e kadar yaşla birlikte artan oranda alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olur. Progresif akciğer enfeksiyonu oluşmasında *P.aeruginosa* kritik bir role sahiptir (1,2,5).

P.aeruginosa'nın aljinat üretimiyle oluşturduğu biyofilm, kronik akciğer enfeksiyonlu kistik fibroz hastalarında en sık görülen şekildir. Biyofilm bakterinin katı yüzeye yapışıp burada çoğalarak içinde gömülü olduğu hücre dışı bir polimer üretmesiyle oluşmaktadır. "Scanning confocal laser microscopy" verilerine göre nonmukoid suşların oluşturduğu biyofilm paketleri 6 µm'den küçükken, mukoid suşların oluşturduğu biyofilm paketleri 40 µm civarındadır. Bu da aljinat varlığının biyofilm oluşumunu attıran bir özellik olduğunu göstermektedir. Biyofilm oluşumuyla bakteri hem hastanın immün sistemine, hem de birçok antibiyotiğe karşı korunur. Biyofilm oluşturan bakteriler oluşturmayanlara göre antibiyotiklere daha dirençlidirler. Eğer bakteri biyofilm oluşturmuşsa antimikrobiyal ilaçların minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri 100 ila 1000 kat artabilir. *P.aeruginosa*'nın mukoid, aljinat üreten fenotipiyle oluşan kronik endobronşiyal enfeksiyonların antibiyotiklerle tam eradikasyonu neredeyse imkansızdır (26-29).

Mukoid suşların yardımı ile *P.aeruginosa*'nın varlığının uzun süreli olması dokuların iki yoldan hasar görmesine neden olmaktadır. Bunlardan birincisi ortama saldığı virulans faktörlerinden kaynaklanmaktadır. İkincisi ise kronik enfeksiyonlara karşı oluşan immün yanıtın doku hasarına neden olmasıdır. Mukoid *P.aeruginosa* suşları ile enfekte kistik fibrozlu hastaların bronşiyal sıvılarında bulunan immün komplekslerin, bu hastaların akciğerlerinde enflamatuar reaksiyonların artmasından ve akciğer fonksiyonlarının bozulmasından sorumlu oldukları gösterilmiştir. İmmün komplekslere bağlı doku hasarının yanısıra solunum yollarındaki antiproteaz

inhibitörlerinin varlığına rağmen fagositik hücre ve bakteri orijinli proteolitik enzimler de doku hasarına neden olabilmektedirler (2,26,28).

2.5.2. Diğer *P.aeruginosa* Enfeksiyonlar

P.aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezi bakterinin hem invazif hem de toksinojenik olması nedeniyle karmaşıktır. Enfeksiyonlar üç aşamada gerçekleşirler. Bu aşamalar;

1. Bakterinin tutunması ve kolonizasyonu,
2. Lokal invazyon,
3. Sistemik yerleşme ve sistemik hastalık şeklindedir.

P.aeruginosa'nın mukozaya kolonizasyonu pili veya fimbria aracılığı ile bakterinin epitel hücrelerine bağlanması sonucu oluşmaktadır. Solunum yollarında çeşitli faktörlerle doku hasarının oluşması bu bağlanmayı kolaylaştıracak yönde etki yapmaktadır (2,3).

Bu patogenezi aşamalarını *P.aeruginosa*'nın virulans faktörleri düzenler. Her aşama, bir sonraki aşamanın oluşabilmesi için gereklidir fakat hastalık herhangi bir aşamada ortaya çıkabilmektedir (2,3).

Normalde sağlıklı kişilerin florasında bulunan ve bu kişilerde hastalık oluşturmayan veya nadiren hastalık oluşturan *P.aeruginosa*; özellikle mukoid tipleri kistik fibrozlu hastaların yanı sıra, nötropeni, yanık ve AIDS gibi bağışıklık ödüllü olgularda, prematüre bebeklerde ve hastanede yatan hastalarda sıklıkla enfeksiyona neden olan önemli bir fırsatçı patojendir. Ayrıca bu hasta gruplarında yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonlar oluşturması ve çeşitli antibiyotiklere dirençli olması nedeniyle hastane enfeksiyonu etkeni olarak önem kazanmıştır (2,3). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P.aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (30).

Septisemi: Yenidoğanda, bağışıklık ödüllü kişilerde, AIDS ve kanser hastaları gibi immunosupresif ilaç alan bireylerde, yara veya yanık enfeksiyonu gibi çeşitli lokal enfeksiyonlardan kaynaklanarak ortaya çıkmaktadır. *P.aeruginosa* sepsislerinde ölüm oranı çok yüksektir. Hastalık sırasında vezikül, bül ve sonunda ektima gangrenozum adı verilen, hemorajik ve nekrotik yaralar şeklinde gelişme gösteren döküntüler görülür.

Bunların oluşumu kapiller damarlardaki *P.aeruginosa*'ların deriye lokalizasyonu ile olur (1,2).

Endokardit: *P.aeruginosa* protez kalp kapağı bulunan hastalarda protez kalp kapağına, ilaç bağımlılarında doğal kalp kapağına yerleşerek enfektif endokardite neden olabilmektedir. Triküspid kapak tutulumu daha sık olmakla birlikte pulmoner, aortik veya mitral kapak ve her iki atriyumun mural endokardiyumu tutulabilir (2,5).

Menenjit: Çoğu kez lomber ponksiyon ya da lomber anestezi sırasında bakterinin kontamine iğne veya eriyiklerle BOS'a verilmesi sonucunda oluşan ağır pürülan menenjit gelişir. Septisemi sırasında kan yolu ile bakterinin meninkslere ulaşması da menenjite neden olabilmektedir (1,2,5).

Yanık ve yara enfeksiyonları: Çeşitli yollarla bulaşan bakteriler yara ve yanıklarda lokal ve çoğu kez mavi yeşil renkte pü görülen enfeksiyonlara neden olur. Ağır yanıklarda deride hakim olan gram pozitif flora yerini gram negatif çomaklara ve özellikle *P.aeruginosa*'ya bırakır. Böylece yanık bölgesinde kolonize olan *P.aeruginosa* dokunun bir gramında 10^5 bakteri konsantrasyonuna ulaşır. Alttaki subkutan bölgeye geçip fibröz septa ve lenfatikler boyunca ilerleyip perivasküler dokuda çoğalarak kan dolaşımına geçer. Yanıklı hastalardaki *Pseudomonas* sepsisinde tedavideki tüm gelişmelere karşın mortalite %78 gibi çok yüksek bir orandadır (1,2,5).

İdrar yolu enfeksiyonları: Bulaşma çoğu kez yatan hastalarda *P.aeruginosa* ile kontamine sonda veya sistoskop gibi aletlerin kullanılması sonucu olur. Sistit ve bakterilerin yukarı idrar yollarına ulaşmaları sonucunda nozokomiyal piyelit ve piyelonefrit gelişir (2,5).

Göz enfeksiyonları: Penetran travma sonrası göze yabancı cisim ile veya kontamine damlaların damlatılması ile gelişebilen ve bazen görme kaybı ve endoftalmitte neden olabilecek enfeksiyonlardır. Kontamine kozmetik ürünleri, kontakt lensler ve lens solüsyonları sağlam gözde bile bu tür enfeksiyonların oluşmasına neden olabilmektedir. Yenidoğanda damlacık enfeksiyonları da bu sonuca ulaşabilir. Göz enfeksiyonları konjonktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit şeklinde gelişebilirler (1,2,5).

Kulak enfeksiyonları: *P.aeruginosa* dış kulak yolu normal florasında ender olarak bulunur fakat yaralanma, maserasyon, enflamasyon veya sürekli nem ortamında eksternal otit adı verilen ve kendiliğinden iyileşebilen tabloya neden olabilir. Ağırlıklı olarak yaşlı ve diyabetik kişilerde, kısmen de damar hastalığı olan kişilerde malin eksternal otit adı verilen tablo görülebilir. *P.aeruginosa*'nın neden olduğu kulak

enfeksiyonlarından biri de otitis media'dır. Hem malin eksternal otit hem de primer akut otitis media, mastoidite neden olabilmektedir (2,5).

Bronşit ve bronkopnömoni: Entübasyon ve bronkoskopi gibi solunum yoluna ait invazif girişimlerden sonra *P.aeruginosa* ile alt solunum yolu enfeksiyonu gelişebilir. Bronkopnömonilerde lokal abseler gözlemlenir ve balgamda bol miktarda *P.aeruginosa* bulunabilir. *P.aeruginosa*, solunum veya immün sisteminde bozukluk olan kişilerde akut fatal bakteriyemik pnömoniye neden olabilir (1,2,5).

Kemik ve eklem enfeksiyonları: Hematojen veya komşuluk yolu ile enfeksiyon oluşur. Hematojen enfeksiyonlar genellikle intravenöz ilaç bağımlılarında; üriner sistem veya pelvik enfeksiyonu takiben; komşuluk yolu ile enfeksiyon ise penetran travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku enfeksiyonu sonrasında gelişir (2,5).

Gastrointestinal sistem enfeksiyonları: *P.aeruginosa* orofarinksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde kolonizasyon yapabilir. Enfeksiyon en sık yenidoğanlarda, hematolojik malinitesi olanlarda ve kemoterapi gören nötropenik hastalarda ortaya çıkar. *Pseudomonas* sepsisi için gastrointestinal sistem önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (2,5).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları: Yanık, travma, dekübit ülserleri veya dermatit ile bütünlüğü bozulmuş deride, nem de varsa, primer diffüz veya lokalize *Pseudomonas* deri lezyonları meydana gelebilir. *P.aeruginosa* bakteriyemisi sırasında da deri lezyonları gelişebilmektedir (2,5).

2.6. *P.aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

Çok sık görülen direnç sorunları nedeniyle *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı duyarlılık deneyi sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisinler; seftazidim, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem ve meropenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktamlar; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır (1,2,5).

Beta laktamlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler,

sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş temel alt gruba ayrılırlar. Beta laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyellerin başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (31).

2.7. *P.aeruginosa*'da Antibiyotik Direnci

Biyofilm direnci: Biyofilm içindeki mikroorganizmalar bir ölçüde saklı kaldıkları için fagositik hücreler tarafından tanınmamakta ve böylece fagositozdan korunmaktadırlar. Biyofilm aynı zamanda antimikrobiyal ilaçlar için polianyonik bir bariyer oluşturarak ilaç direncine yol açmakta, özellikle beta laktam antibiyotiklerin hücre içine penetrasyonunu önleyerek tedaviyi güçleştirmektedir. Ayrıca biyofilmin alt katmanlarına doğru pH değeri yedinin altına inmekte ve böylece antibiyotiklerin işlevleri bozulmaktadır. En alt katmanlarda ise oksijen geçişi olmadığı için anaerob koşullar oluşmakta ve bu nedenle antipseudomonal ajanlar tek başlarına etki edememektedirler (32).

Pompa (efluks) direnci: Pompa direnci eskiden beri bilinen fakat bakterilerdeki yaygınlığı ve etkinliği daha yeni anlaşılmaya başlayan bir mekanizmadır. Bakterilerdeki pompa sistemleri transport proteinlerinden oluşur. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici bir gen kontrolünde çalışır. Antibiyotik dışarı pompalanınca bakteride hücre içi antibiyotik düzeyi düşer, ribozom antibiyotik etkisinden korunur ve protein yapımı yani bakteri üremesi devam eder. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşma sonucu pompa sistemi indüklenirse, düzenleyici gende mutasyon ile pompa proteinlerinin aşırı üretimi başlayabilir. Sonuç bir ya da birden çok substrata direnç şeklindedir. Gelişen direnç düşük düzeylidir fakat bir mutasyon başka mutasyonları tetikleyebildiği için, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından bakteride antibiyotiğin bağlandığı hedefin değişmesi, antibiyotiğe geçirgenliğinin azalmasına yol açacak şekilde porin üretiminin bozulması veya antibiyotiği parçalayan bir enzimin sentezlenmesi gibi diğer bir mutasyon gelişir ve direnç düzeyi katlanarak artar (33, 34).

2.7.1. Beta Laktamaz Enzimleri

Beta laktamaz enzimleri ile inaktivasyon beta laktam antibiyotiklere karşı dirençte en sık gözlenen mekanizmadır (35,36). Beta laktamaz etkisiyle beta laktam

halkası hidrolize uğrayarak açılır ve sonuçta antibiyotik etkisiz hale gelir. Her gram negatif bakteri türe özgül olmak üzere genellikle az miktarda kromozomal beta laktamaz sentezlemektedir (37).

İlk beta laktamaz enzimi penisilinin ticari olarak kullanıma girmesinden çok daha önce bir *Escherichiae coli* suşunda tanımlanmıştır (38). İlk plazmid kökenli beta laktamaz TEM-1 adıyla 1965'te bir *E.coli* izolatında bildirilmiştir (39).

Penisilinin tedavide kullanılmaya başlamasından sonra ilk olarak *Staphylococcus aureus*'ta ve daha sonraları da farklı bakterilerde plazmid kökenli penisilinaza bağlı penisilin direnci saptanmıştır (35,38,40).

Abraham ve Chain'in 1940 yılında bildirdikleri penisilinaz ile birlikte beta laktamazların ilk sınıflandırılması yapılmıştır. Bundan sonra yapılan ve kabul gören ilk sınıflandırma, Sawai ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırma olmuştur. Sawai 1968 yılında enzimleri penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayırmıştır. Richmond ve Sykes ise 1973 yılında yaptıkları sınıflandırmada o güne kadar bilinen tüm gram negatif bakteri beta laktamazlarını substrat profillerine göre beş grupta toplamışlardır (35). Daha sonra Matthew (41) özgül beta laktamazların izoelektrik nokta tayini (Isoelectric Focusing, IEF) yöntemi ile tanımlanacağını gösterdikten sonra 1976'da bu şema Sykes ve Matthew tarafından tekrar düzenlenmiştir. 1981'de Mitsunashi ve Inoue'nin yaptığı sınıflamaya sefuroksimi hidrolize eden beta laktamazlar kategorisi de eklenmiştir. Moleküler yapı ile ilgili sınıflandırma ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Sınıf C sefalosporinazlar 1981 yılında Jaurin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidrolize eden D sınıfı enzimler ise 1980'lerin sonunda diğer serin-enzimlerden ayrılmıştır. 1989'da Bush (42) tarafından önerilen gruplamada tüm bakterilerin beta laktamazları yer almış ve ilk kez substrat ve inhibitör özellikleri moleküler yapı ile ilişkilendirilmiştir.

Tablo 2-1: Beta Laktamazlar İçin Bush Sınıflaması (35)*

Bush grubu	Ambler Molekül sınıfı	Tercih edilen substrat	Klav	EDTA	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	-	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri
2a	A	Penisilinler	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrum sefalosporinler, monobaktamlar	+	-	TEM-3 ile TEM-125 arası, SHV-2 ile SHV-56 arası GSBL enzimleri Klebsiella oxytoca K1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, HMS-1, ROB-1, SAR-1
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	+/-	-	OXA-1 ile OXA-58 arası GSBL enzimleri, PSE-2
2e	A	Sefalosporinler	+	-	Proteus vulgaris'in indüklenebilir sefalosporinazları
3	B	Monobaktamlar hariç tüm betalaktamlar	-	+	Stenotrophomonas maltophilia'nın L1'i Bacteroides fragilis'in Ccra'sı
4	ND	Penisilinler	-	?	Pseudomonas cepacia'nın penisilinazı

* 35 No'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

Bush Grup 1: Bush tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Grup 1'de *P.aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* ve *Serratia marcescens* gibi, klinikte sık karşılaşılan gram negatif bakterilerdeki indüklenebilir kromozomal AmpC enzimleri yer almaktadır (36,43). Bakteri tarafından normalde az miktarda sentezlenen bir enzim, ortamdaki bir indükleyicinin etkisiyle daha fazla miktarda sentezlenmeye başlar. Farklı beta laktam antibiyotikler değişik oranda Grup 1 beta laktamazları indükleyebilirler. Fakat bu geri dönüşebilen bir olaydır ve söz konusu beta laktam antibiyotiğin ortamdaki ayrılmasıyla bakteri, enzimi tekrar eski düşük seviyede sentezlemeye devam eder. Sonuçta bu mekanizma klinikte kalıcı bir direnç yol açmamaktadır (42). Ancak bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen mutant suşlar da bulunmakta veya indüklenme sırasındaki mutasyonla enzim hiperproduksiyonu kalıcı hale dönüşmektedir. Bu mutantlar yukarıda saydığımız bakteri türlerinde 10^{-5} - 10^{-8} arasında bir sıklıkta bulunmaktadır (44,45). Bir çok *P.aeruginosa* suşu Bush sınıflandırmasına göre Grup 1'de, Ambler sınıflandırmasına göre Sınıf C'de ve Richmond ve Sykes sınıflandırmasına göre de Sınıf 1'de yer alan indüklenebilir kromozomal beta laktamaz enzimine sahiptirler (46).

Kromozomal beta laktamaz enzimlerinden AmpC proteini *ampC* adı verilen bir gen tarafından kodlanmaktadır. Bu gen normalde *ampR* adı verilen komşu bir gen lokusunun ürünü olan AmpR adlı protein molekülü tarafından baskılanmaktadır.

İndükleyici beta laktam antibiyotiğin bakteri sitoplazmik membranı üzerindeki penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanması ile peptidoglikan sentezi bozulur. Ortaya çıkan peptidoglikan yıkım ürünlerinin periplazmik boşlukta artan yoğunluğu sitoplazmik membran üzerinde bulunan AmpG adlı protein tarafından hissedilir. Bu etkileşim sonucunda AmpG duyarlı hale gelerek AmpR'de protein modifikasyonuna neden olur ve baskılayıcı formdan aktive edici hale dönüşür. Aktive olan AmpR, *ampC*'nin ekspresyonunu ve dolayısıyla da beta laktamaz sentezinin artışını sağlar. İndüksiyon olmadığı bazal koşullarda AmpD proteini AmpE adı verilen başka bir proteinle birleşerek AmpR'yi baskılayıcı formda tutar. Ortamda bir indükleyici olması halinde AmpG ve AmpD arasındaki denge AmpG lehine bozulur ve beta laktamaz indüksiyonu başlar. Eğer bakteri hücrelerinde oluşacak bir mutasyonla AmpD ortadan kalkacak olursa AmpG'nin etkisi sürekli hale gelir ve *ampC* sürekli olarak eksprese edilerek yüksek miktarda beta laktamaz sentezlenir. Bu durumda dereprese mutant suşlar ortaya çıkar. *Pseudomonas*'larda AmpC dışında diğer genler tarafından NMC-A, Sme-1, Sme-2, Sme-3 ve IMI-1 enzimleri kodlanmaktadır ve bu enzimler kromozomal A sınıfı serin karbapenemazlardır (40,47,48).

Bush Grup 2: Yine Bush tarafından yapılan sınıflamaya göre Grup 2'de plazmid aracılığı ile sentezlenen enzimler ile, üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize eden geniş spektrumlu beta laktamazlar bulunmaktadır (43). Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) grubu enzimler TEM-1 veya SHV-1 beta laktamazların aminoasit dizilerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda ortaya çıkmışlardır (37,40). Başlangıçta sadece *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'de tanımlanan bu enzimler giderek diğer Enterobacteriaceae üyelerinde de hızla yayılmışlardır (40,49). Başka bakterilerin plazmidlerini alarak Grup 1 sefalosporinaz üretme kapasitesi kazanmış bu bakterilerde buna ilaveten farklı kromozomal enzimler de bulunmakta ve kodladıkları dirençle birlikte ortaya geniş bir direnç spektrumu çıkmaktadır (42).

Bush Grup 3: Klavulanik asitle inhibe olmayan metalo enzimleri içermektedir. Bunlar EDTA ile inhibe olan enzimlerdir. Aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu gruptaki en önemli enzimler, *S.maltophilia*'nın L1 enzimi, *A.hydrophila*'nın kromozomal enzimleri ve *B.fragilis*'in CcrA enzimidir (43).

Bush Grup 4: Bu grupta klavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlar yer almaktadır. *Alcaligenes faecalis*, *B.fragilis*, *Campylobacter jejuni*'den izole edilen enzimler,

Clostridium butyricum'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta laktamazı bu gruba sokulmuştur (43).

Karbapenemazlar: Karbapenemazlar beta laktamazların A, D (Bush Grup 2 ve 3) veya B (Bush Grup 3) moleküler sınıfına ait olabilirler (43).

A sınıfı karbapenemazlar: Serin karbapenemazlardır, klavulanik asitle inhibe olurlar ve enderdirler. KPC-1 ve GES-2 plazmidik serin-karbapenemaz grubuna giren enzimlerdendir (42,43).

B sınıfı karbapenemazlar: Metallo beta laktamazlardır ve klinik açıdan en önemli karbapenemazlardır. Aztreonam dışındaki tüm beta laktamları hidrolizleyen IMP ve VIM serisi metallo enzimleri içerirler. Metallo beta laktamaz üreten bakteriler genellikle penisilinlere, sefalosporinlere, karbapenemlere ve beta laktamaz inhibitörlerine dirençli olarak saptanırlar (41,42).

D sınıfı karbapenemazlar: D sınıfındaki karbapenemazlar *Acinetobacter baumannii*'de rastlanan ve karbapenemlere düşük düzeyde direnç ya da azalmış duyarlılığa yol açan oksasilineazlar, yani OXA tipi enzimlerdir. D sınıfı karbapenemazlar;

- 1. alt grup: OXA-23, OXA-27 ve OXA-49
- 2. alt grup: OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40
- 3. alt grup: OXA-58
- 4. alt grup: OXA51/69 olmak üzere 4 alt grupta toplanmışlardır (38,42,50,51).

2.7.1.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL)

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) çoğu plazmid kaynaklıdır. Geniş spektrumlu enzimler olan TEM-1, TEM-2 ya da SHV-1'den türemişlerdir ve ilk türedikleri enzimlerden nokta mutasyonlarıyla farklılık gösterirler (50). Çoğunlukla Ambler sınıflamasına göre Sınıf A'ya, Bush sınıflamasına göre ise Grup 2'ye aittirler. Genel olarak geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç sağlarlar. 1980'lerin başlarından beri Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde, özellikle de *K.pneumoniae* ve *E.coli*'de yaygın olarak bildirilirlerken son zamanlarda *P.aeruginosa*'da da görülmektedirler (52,53). Bu enzimler penisilinlere, 1-4. kuşak sefalosporinlere ve aztreonama direnç oluşturmakta; karbapenemlere, sefoksitin ve sefotetan gibi sefamisinlere ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı kalmaktadırlar. GSBL tanımlama testlerinde bu

enzimlerin klavulanik asit ile inhibe olma özelliğinden yararlanılır (39,53). Bugün GSBL'ler;

1. TEM grubu enzimler
2. SHV grubu enzimler
3. CTX-M grubu enzimler
4. GSBL tipi OXA enzimleri
5. Sınıflandırılmayan diğer GSBL'ler (PER, VEB, GES, IBC, vb.) olmak üzere beş grupta toplanmışlardır.

TEM grubu GSBL enzimleri: İlk TEM tipi beta laktamaz enzimi 1965'te bir *E.coli* klinik izolatından bildirilmiş ve TEM-1 olarak adlandırılmıştır (53). Bu adı ilk izole edildiği hastanın adı olan 'Temoniera'dan almıştır (54). Daha sonra sadece bir aminoasit farkıyla TEM-1'in varyantı olan TEM-2 *P.aeruginosa*'da bulunmuştur. Bazı inhibitör enzimler dışında TEM-3'ten başlayarak TEM enzimleri GSBL özelliğindedirler. TEM-125 en son bulunan TEM varyantıdır (55).

SHV grubu GSBL enzimleri: SHV enzimi adını, bu beta laktamazın biyokimyasal yapısını tanımlayan 'sulphydryl variable' sözcüklerinden almıştır. SHV-1 penisilinlere karşı etkili olan dar spektrumlu bir beta laktamazdır. Kromozomal kaynaklı bir beta laktamaz olarak ilk kez *Klebsiella* spp.'de bulunmuştur. İlk genişlemiş spektrumlu SHV enzimi olan SHV-2, 1983'te *K.pneumoniae*, *K.ozaenae* ve *S.marcescens* izolatlarında bulunmuştur (54). En son bulunan SHV varyantı seftazidime dirençli, sefazoline duyarlı bir *E.coli* suşundan izole edilmiş olan SHV-57'dir. SHV grubunda da inhibitör dirençli SHV türevleri bulunmaktadır (56).

CTX-M grubu GSBL enzimleri: CTX-M tipi GSBL'ler dünyadan yaygın bir şekilde bildirilmekte ve Enterobacteriaceae'de plazmidler üzerinde taşınmaktadır. CTX-M'in, *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal beta laktamazından mutasyonla oluştuğu düşünülmektedir (57). Sefotaksime direnç sağladığı için bu adı almıştır (54,58). CTX-M tipi enzimler ilk olarak 1989'da Almanya'dan, 1992'de Fransa ve Arjantin'den, daha sonra dünyada birçok ülkeden; *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *Salmonella enterica serovar typhimurium* başta olmak üzere Enterobacteriaceae ailesine ait birçok klinik izolattan bildirilmiştir. En yüksek CTX-M prevalansı bugün için Latin Amerika, Doğu Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerindedir. Günümüzde CTX-M ailesinde 40'tan fazla enzim

bulunmaktadır ve bunlar aminoasit dizilerindeki benzerliklerine göre CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olmak üzere beş gruba ayrılmıştır.

- CTX-M-1 grubunda; CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15(UOE-1), -22, -23, -28, -29, -30
- CTX-M-2 grubunda; CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1
- CTX-M-9 grubunda; CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -27, Toho-2
- CTX-M-25 grubunda; CTX-M-25, -26 bulunmaktadır.
- CTX-M-8 tek başına bir grup oluşturmaktadır.

CTX-M tipi enzimlerin genel olarak sefotaksime karşı seftazidimden daha güçlü aktivite gösterdiği bilinmektedir. CTX-M-15 Kamerun, Hindistan, Japonya, Rusya, İtalya, Polonya, Fransa, Bulgaristan, Romanya ve Türkiye'den bildirilmiştir (57,58). CTX-M-15 Türkiye'de ilk olarak Ekim 2001'de cerrahi ünitesinde yatan bir hastanın idrar kültüründe üreyen çoğul dirençli bir *K.pneumoniae* suşundan izole edilmiştir. Bu suş imipenem dışında bütün beta laktam antibiyotiklere dirençli bulunmuştur (58). CTX-M tipi GSBL enzimleri dünyanın farklı bölgelerinde izole edilirken 2001 yılına kadar ABD'den bildirilmemiştir. Ancak, 2001-2002 yıllarını kapsayan ve Virjinya, Idaho, Ohio, Washington ve Teksas eyaletlerini içeren çalışmada dokuz izolatta CTX-M tipi GSBL'ye rastlanmıştır (59).

GSBL tipi OXA enzimleri: OXA grubu içinde geniş spektrumlu, genişlemiş spektrumlu ve karbapenemaz özellikli alt grup enzimler bulunmaktadır. OXA-10 enzimi, OXA-1'den OXA-10'a kadar olan enzimlere oranla daha geniş spektrumlu bir enzimdir. Sefoperazona yüksek düzey direnç oluşturmakta; eğer çok miktarda sentezlenirse, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson duyarlılıklarında azalmaya yol açabilmektedir. Son yıllarda bu enzimlerin de genişlemiş spektrumlu mutantlarının ortaya çıktığı saptanmıştır. Bunlardan ilki OXA-11 enzimidir. OXA-11 ilk olarak 1991'de Ankara'da yanık nedeniyle hastanede yatan bir hastanın kan kültüründen izole edilen bir *Pseudomonas* suşunda bulunmuştur (60). Daha sonra aynı hastanede izole edilen farklı *Pseudomonas* suşlarında OXA-14, OXA-15, OXA-16, ve OXA-17 beta laktamazları tanımlanmıştır (61-64). OXA-15 enziminin OXA-2'den, diğerlerinin ise OXA-10 dan türediği saptanmıştır. OXA-11, OXA-14, OXA-15, ve OXA-16 seftazidim direncine yol açarken OXA-17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır (60-63,65).

Türkiye’de izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarında OXA-10’dan türemiş GSBL tipi OXA türevi beta laktamazlara sık rastlanmaktadır (66).

Sınıflandırılmayan diğer GSBL enzimleri:

PER: Bu grupta yalnız PER-1 ve PER-2 bulunmaktadır. PER-1 enzimi sefalosporinlere (seftriakson, sefotaksim, seftazidim) ve daha az olarak da aztreonama direnç gelişmesine neden olur (67,68). Hibridizasyon deneyleri sonuçlarına göre bu beta laktamazın daha önce bildirilen geniş veya genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardan türememiş olması ilgi çekmektedir (69). PER-1, TEM ve SHV grubuna bağlı olmayan GSBL’lere en önemli örnektir. PER-1 enziminin aktivitesi klavulanik asitle, sulbaktamla ve nadiren de moksalaktam ve imipenemle inhibe olur (67,68). PER-1 üreten suşlarda beta laktam direncinin yanı sıra gentamisine yüksek ve amikasinine düşük düzeyde direnç görülür. İmipenem ve meropenem ise PER-1 den etkilenmez (67). PER-1 ilk olarak Fransa’da bir Türk hastanın idrar kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* izolatında bulunmuş, daha sonra *S.typhimurium* izolatlarında tanımlanmıştır (68,69). PER-1 enzimi Türkiye’de *Acinetobacter* spp. ve *P.aeruginosa* izolatlarında sık olarak identifiye edilmektedir. Türkiye ve Fransa dışında Kore ve Belçika’da da PER-1’e rastlanmıştır (68,70,71). PER-2 Arjantin’de *K.pneumoniae*, *E.cloacae* ve *E.coli* suşlarından izole edilmiştir (72).

VEB: VEB-1 ilk olarak Vietnam’da bir *E.coli* klinik izolatında bulunmuştur ve bu nedenle adını Vietnam’dan almıştır (Vietnamese Extended-Spectrum Beta-Lactamase), daha sonra Tayland’da iki *P.aeruginosa* klinik izolatından identifiye edilmiştir. VEB tipi beta laktamazlara sahip olan izolatlar seftazidime, sefepime ve piperasiline dirençlidir. VEB grubu içinde VEB-1, VEB-2 ve VEB-3 olmak üzere üç enzim tipi bulunmaktadır (73,74).

GES/IBC: İlk GES enzimi 1998’de Fransa’da bir çocuk hastadan izole edilen *K.pneumoniae* suşunda bulunmuş ve bu enzime GES-1 adı verilmiştir (75). GES-1, TEM veya SHV kaynaklı GSBL’ler ile yalnız %30 aminoasit benzerliğine sahiptir fakat GES türevleri olan GES-1 ve GES-2, IBC-1 ve IBC-2 ile yapısal olarak çok benzer bulunmuştur. IBC-2, GES-1 enziminden sadece bir, IBC-1’den ise iki aminoasit farklılığına sahiptir (50). GES tipi enzimler klavulanik asitle inhibe olan beta laktamazlardandır (76). GES-1 serin GSBL enzimi olmakla birlikte, bir çok GSBL’den farklı olarak aztreonama karşı hidrolitik aktiviteye sahip değildir; sefoksitine afinitesi

vardır ve özellikle seftazidimi hidrolize eder (77). GES-2 de serin enzimdir fakat karbapenemazlar grubuna girer, çünkü meropeneme etki etmemekle birlikte, imipeneme karşı düşük düzeyli hidroliz özelliği bulunmaktadır (78). GES-1'in son varyantı olan GES-9 karbapenemleri hidrolize etmez ancak monobaktamlara karşı aktivitesi diğer GES-1 türevlerinden daha fazladır (79).

Tablo 2-1: GES türevi enzimlerin aminoasit değişiklikleri ve bununla ilgili hidroliz profilleri (77,78,79)

GES Türevleri	Ambler pozisyonu			Hidroliz profilleri			
	62	170	243	CAZ	FOX	AZT	IMP
GES-1	R	G	G	+	-	-	-
GES-2	R	N	G	+	-	-	+
GES-3	R	S	G	+	+	-	+
GES-5	T	G	G	+	-	-	+
GES-7 (IBC-1)	R	G	C	+	+	-	-
GES-9	R	G	S	+	-	+	-

2.7.1.2 Metallo Beta Laktamazlar (MBL)

MBL'ler Ambler sınıflamasına göre Sınıf B'de, Bush sınıflamasına göre Grup 3'te yer alırlar. MBL aktivitesi çinkoya bağlıdır ve EDTA veya merkaptopropionik asit ile inhibe olabilmektedir. MBL tanımlama testlerinde bu enzimlerin EDTA ile inhibe olma özelliğinden yararlanır (80,81). Metallo enzimler imipenemi ve meropenemi iyi hidrolize ederler ancak aztreonama etkisizdirler. Bu enzimler aktif bölgelerindeki çinko iyonu aracılığıyla karbapenemleri hidrolize ettikleri için karbapenemazlar olarak adlandırılırlar (82). MBL'lerin metal iyonları beta laktam halkasının siklik amid bağı kırarak nükleofillere yardımcı nitelikteki su moleküllerini koordine ve biyolojik olarak antibiyotiği inaktive ederler. MBL'ler geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikleri yüksek oranda hidrolizlerler. MBL üreten gram negatif bakteriler genellikle oksiminosefalosporinler, sefamisinler ve karbapenemlerin de dahil olduğu birçok geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiğe direnç göstermektedirler (81). MBL'ler *Bacillus cereus*, *B.fragilis*, *S.malthophilia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Janthinobacterium lividum*, *Aeromonas* spp. ve *Caulobacter crescentus*'un dahil olduğu saprofit veya patojen birçok bakteride identifiye edilmişlerdir (82,83). Bu bakterilerden

S.malthophilia ve *B.fragilis* dışındakiler klinik örneklerden seyrek olarak izole edilirler (82). Nozokomiyal patojenlerin en önemlileri MBL üreten gram negatif bakterilerdir. Bu suşların yaygınlaşmasının gelecekte bir seri global probleme neden olabileceği düşünülmektedir (81). Günümüze kadar bildirilmiş olan beş ayrı MBL türü bulunmaktadır. Bunlar IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (Sao Paulo Imipenemase), GIM-1 (German Imipenemase) ve SIM-1 (Seul Imipenemase) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IMP ve VIM tipleri en sık rastlananlardır ve dünya çapında yaygındırlar. SPM-1 Güney Amerika’da (Brezilya) yaygındır ve henüz başka bölgelerden bildirilmemiştir. GIM-1 ve SIM-1 ise yalnız birer suшта tanımlanmıştır (84).

IMP: İlk kez 1991 yılında Japonya’da izole edilen bir *S.marcescens* suşunda bulunmuştur (82). IMP-1 kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilen bir MBL’dir. Penisilinlere, sefalosporinlere, sefamisinlere, oksasefamisinlere ve karbapenemlere direnç sağlamaktadır fakat monobaktamlara etki etmemektedir (80,85). IMP tipi enzimler Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa* ve diğer gram negatif nonfermentatif bakterilerden izole edilen ilk MBL’lerdir. IMP-1’in Uzak Doğu’nun diğer ülkelerinde, Avrupa’da, Kanada’da, ABD’de, Güney Amerika’da ve Kuzey Afrika’da da görülmesi bu enzimin geniş bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir (81,86,87). IMP-1’in bir varyantı olan IMP-2 İtalya’da bir *A.baumannii* suşundan izole edilmiş ve bu ilk Avrupa örneği olmuştur (87). 2002 yılında Brezilya’da bronkojenik karsinomu olan bir hastadan izole edilen *P.aeruginosa* suşunda bulunan IMP-16 en son bulunan IMP tipi enzimdir (88).

VIM: İlk VIM enzimi olan VIM-1 İtalya’da 1997’de bir *P.aeruginosa* suşunda bulunmuş ve kromozomal kaynaklı olduğu saptanmıştır (80,81). *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan penisilinleri, sefalosporinleri, sefamisinleri, oksasefamisinleri ve karbapenemleri hidrolize eder fakat monobaktamlara etkisizdir. VIM-1, IMP-2 ile %28 aminoasit benzerliğine sahiptir (80). VIM tipi enzimler Avrupa ve Güney Asya’da *P.aeruginosa* izolatlarında bulunmuşlardır ancak VIM-7 varyantı ABD’den de bildirilmiştir (76,89). VIM-tipi MBL’ler ilk olarak *P.aeruginosa*’da tanımlanmış, daha sonra diğer nonfermentatif gram negatif çomaklarda ve Enterobacteriaceae üyelerinde de saptanmıştır. Bu güne kadar 12 VIM varyantı saptanmış ve bunlar VIM-1, VIM-2 ve VIM-7 olmak üzere üç alt grupta toplanmışlardır. VIM-1 grubu; VIM-4, VIM-5 ve VIM-11A’yı; VIM-2 grubu VIM-3,

VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10 ve VIM-11B'yi kapsamaktadır. VIM-7 ise diğer VIM tiplerinden belirgin bir şekilde farklı olduğu için tek başına bir grup oluşturmaktadır. 2005 yılında Yunanistan'da cerrahi operasyon geçirmiş bir hastanın kan kültüründe üreyen bir *K.pneumoniae* suşundan izole edilen VIM-12 en son bulunan VIM-tipi enzimdir. VIM-12, VIM-1 ile %97 ve VIM-2 ile %93.6 aminoasit benzerliğine sahiptir (90).

SPM: SPM-1 ilk olarak 1997'de Sao Paulo-Brezilya'da bir *P.aeruginosa* izolatından identifiye edilmiştir (81,91). SPM-1 daha sonra Brezilya'da yaygınlaşmış ancak dünyanın diğer bölgelerinde bu enzime rastlanmamıştır (92). IMP ve VIM'den farklılık gösteren yeni bir MBL'dir (87). SPM-1, IMP-1 ile yalnız %35.5 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. SPM-1 de, IMP ve VIM varyantları gibi beta laktamları hidrolize etmekte ancak aztreonama etki etmemektedir. SPM-1 bilinen tek SPM türevi enzimdir (93).

GIM: GIM-1 ilk kez Almanya'da, SENTRY çalışması kapsamına giren karbapenem dirençli bir *P.aeruginosa* izolatında bulunmuştur. Yeni bir MBL türü olan GIM-1 daha önce tanımlanan diğer dört MBL türünden farklı olmakla birlikte, IMP-1 varyantları ile %40 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. GIM-1, MBL ailesinin diğer üyelerine benzer özellikler taşır. Bununla birlikte, diğer MBL türü enzimler imipeneme meropenemden daha fazla etki ederlerken GIM-1'in imipeneme ve meropeneme etkisi eşit orandadır. GIM-1 dışında başka GIM türevi enzim bulunmamaktadır (94).

SIM: SIM-1 yeni bir MBL alt sınıfıdır. İlk kez Seul'de pnömonili bir hastanın balgam kültüründen izole edilmiş olan *A.baumannii* suşunda tanımlanmıştır. Diğer MBL'lerden farklı olmasıyla birlikte IMP-1 ailesinden IMP-12 ile %69 ve IMP-9 ile de %64 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. SIM-1 bilinen tek SIM türevi enzimdir (84).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesinde yatan 24'ü, çocuk 26'sı erişkin olmak üzere 50 ayrı hastadan izole edilmiş olan ve en az üç antibiyotik grubuna dirençli olduğu için çoğul dirençli olarak kabul edilen 50 adet *P.aeruginosa* suşu incelenmiştir.

Suşlar klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmış ve çalışmaya alınmıştır. Gerektiğinde API ID 32 GN (Bio Meriéux, Fransa) identifikasyon kiti kullanılmıştır.

3.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon ve agarda dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Deneylerde 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerleri (BBL, ABD) kullanılmıştır.

3.1.1. Disk Difüzyon Yöntemi

İzole edilen suşların tikarsilin (75µg), tikarsilin/klavulanik asit (85µg), meropenem (10µg), imipenem (10µg), piperasilin (100µg), seftriakson (30µg), seftazidim (30µg), sefoperazon (75µg), sefepim (30µg), aztreonam (30µg), siprofloksasin (5µg), gentamisin (10µg) ve tobramisine (10µg) karşı antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, eski adıyla NCCLS) önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır (95). Bu yöntemde, incelenecek suşların 18-24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerinden doğrudan Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) (BBL, ABD) içinde süspansiyonları hazırlanarak, inokulum yoğunluğu McFarland 0.5 standardına göre ayarlanmıştır (1,5x10⁸ cfu/ml). İnokulum hazırlandıktan sonra steril bir eküvyon yardımıyla yüzeyi kurutulmuş MHA besiyerinin tüm yüzeyine inoküle edilmiştir. Ekim yapılmış besiyeri üzerine antimikrobik ilaç diskleri yerleştirilmiştir. Yerleştirilen disklerin merkezleri arasındaki ve petrinin kenarına olan uzaklıkları yaklaşık 25 mm olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiyerleri 18-24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek yine CLSI sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. Kalite kontrol amacıyla

standart suş olarak *E.coli* ATCC 35218, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* 27583 kullanılmıştır (95).

3.1.2. Agarda Dilüsyon Yöntemi

İncelenen suşların tikarsilin, tikarsilin/klavulanik asit, meropenem, imipenem, piperasilin, seftriakson, seftazidim, sefoperazon, sefepim, aztreonam, siprofloksasin, gentamisin ve tobramisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri CLSI standartlarına uygun olarak agarda dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır (95). Belirlenen MİK aralığında iki kat seri dilüsyonlar yapılarak MİK değerleri saptanmıştır. Bu yöntemde MİK sınır değerleri aşağıdaki formüllerle belirlenmiştir.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{potens } (\mu\text{g/mg})}{\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

Antimikrobik çözeltilerin uygun dilüsyonları, sıcaklığı su banyosunda 48-50°C' ye getirilmiş ve erimiş haldeki MHA besiyerine eklenmiştir. Agar ve antimikrobik çözelti iyice karıştırılmış ve 20 ml karışım düz bir yüzeyde, agar kalınlığı 4 mm olacak şekilde petri kutularına dökülmüştür. Doğrudan koloni süspansiyon yöntemi ile 18-24 saatlik agar plağında üremiş kolonilerden MHB besiyerinde süspansiyon yapılmış ve süspansiyon yoğunluğu McFarland'ın 0.5 no'lu standart bulanıklığına eşdeğer olacak biçimde ayarlanmıştır. Bu süspansiyon, istenen 10⁷ cfu/ml inokulum yoğunluğunu elde edebilmek için yine steril MHB besiyeri kullanılarak 1/10 oranında sulandırılmıştır. Daha sonra sulandırım yapılmış tüplerden her süspansiyon için yaklaşık 200 µl alınıp replikatörün (Mast Diagnostik, Almanya) inokulum parçasına denk gelen kuyucuğa konulmuş ve replikatör yardımıyla her kuyucuktan agar yüzeyine 1-2 µl inokulum aktarabilecek metal iğneler kullanılmıştır. Böylece agar yüzeyinde yaklaşık 10⁴cfu/ml

inokulum oluşması sağlanmıştır. Önce antibiyotik içermeyen kontrol plağına ve daha sonra en düşük konsantrasyondan başlamak üzere en yükseğe doğru farklı antibiyotik konsantrasyonları içeren plaklara inoküle edilmiştir. Aerop koşullarda, 35°C’de, 18-24 saatlik inkübasyon sonunda, üremenin engellendiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. Deneyler sırasında kalite kontrol amacıyla standart suş olarak *E.coli* ATCC 35218, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* 27583 kullanılmıştır.

3.2. Çift Disk Sinerji Yöntemiyle GSBL Saptanması

Klavulanik asit ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerle yapılan çift disk sinerji testiyle GSBL saptanması deneyi yalnız *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli* için standardize edilmiş bir yöntemdir. Ancak bu deney, kromozomal AmpC gibi doğal beta laktamazlara sahip suşlarda yalancı negatiflik; GES-2’de olduğu gibi klavulanatla inhibisyona göreceli direnç; GSBL ile birlikte aynı anda karbapenemazların, metalo enzimlerin ya da GSBL tipi OXA enzimlerinin varlığı; impermealite ve efluks gibi farklı direnç mekanizmalarının birarada bulunması durumlarında *P.aeruginosa*’da GSBL tanısı için uygun değildir (78). Ancak, bir ön bilgi vermesi amacıyla uygulanmıştır.

Deney için MHA yüzeyine 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Tarama testi için plakların merkezine amoksisilin-klavulanik asid diski ve çevresine merkezden merkeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde aztreonam, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, sefoperazon ve piperasilin diskleri yerleştirilmiştir. Amoksisilin-klavulanik asid diskiye doğru beta laktam inhibisyon zon çapının genişlemesi tahmini GSBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir. (95).

3.2.1. GES tipi GSBL Varlığının Saptanması

P.aeruginosa’da klavulanik asitin kullanıldığı klasik çift disk sinerji deneyiyle VEB-1 ve PER-1 pozitif suşların GSBL pozitifliğini saptamak daha kolay, ancak GES-tipi enzimleri saptamak daha zordur. İmipenem ve seftazidim ile yapılan çift disk sinerji testi, GES ve PER-1 tipi GSBL varlığını ortaya koyabilmektedir. Ancak bu sinerji imipenemin, kromozomal AmpC’yi de indüklemesi sonucu bazı durumlarda gözlenemeyebilir. Kloksasilin AmpC enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiği için, *P.aeruginosa*’da GES tipi enzim araştırmasında kloksasilinli MHA’da imipenem ve seftazidimle yapılan sinerji deneyi kullanılmaktadır (78).

MHA besiyeri hazırlanmış ve 55°C'ye kadar soğutulup ml'de 200 µg olacak şekilde kloksasilinle karıştırılıp petrilere dokülmüştür. Daha sonra bu plaklara merkezden merkeze uzaklıkları 20 mm olacak şekilde seftazidim ve imipenem diskleri yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda imipenem zon çapının seftazidime doğru genişlemesi GES tipi GSBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir (78).

3.3. Kromozomal İndüklenebilir Beta Laktamaz (İBL) Varlığının Araştırılması

Kromozomal indüklenebilir beta laktamazları saptamak için MHA yüzeyine 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. İnokülasyon işleminden sonra beta laktamaz indükleyicisi olarak imipenem diski ve bundan 20 mm uzaklığa da seftazidim diski yerleştirilmiştir. Seftazidimin indükleyici olan imipeneme bakan yüzünde inhibisyon zonunun belirgin olarak daralması İBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir (95).

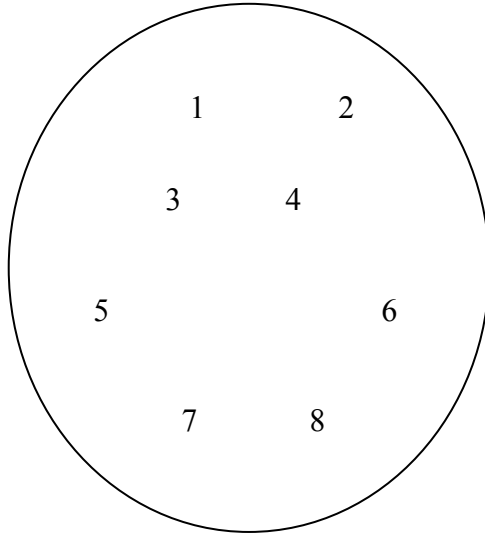
3.5. MBL Varlığının Araştırılması

3.5.1. E-test

MHA yüzeyine 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. İnokülasyon işleminden sonra imipenem (4-256 µg/ml) ve imipenem (1-64 µg/ml)+EDTA içeren E-test stripleri agar yüzeyine yerleştirilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda imipenem: imipenem+EDTA MİK oranının en az sekiz olması MBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir.

3.5.2. 0,1 ve 0,5 M EDTA ile çift disk sinerji ve kombine disk testleri

MHA yüzeyine bakteri süspansiyonu inokülasyonundan sonra plakların üzerine merkezden merkeze 20 mm uzaklıkta 1, 3, 4 ve 7 no'lu pozisyonlarda dört imipenem diski; 2, 5, 6 ve 8 no'lu pozisyonlara dört boş disk konmuştur. 3 no'lu imipenem diskine ve 2 ve 5 no'lu boş disklere 0,5 M EDTA'dan; 4 no'lu imipenem diskine ve 6 ve 8 no'lu boş disklere 0,1 M EDTA'dan 10'ar µl damlatılmıştır (şekil 3-1). İzleyen gün yapılan değerlendirmede 1 ve 7 no'lu imipenem zonlarında EDTA'ya doğru genişleme; 3 ve 4 no'lu imipenem disklerinin zon çaplarında ise 7 ve 4 mm artış olması MBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir (96).



- | |
|---|
| 1: IMP diski |
| 2: Boş diske 10 µl 0,5 M EDTA damlatılmıştır. |
| 3: Boş diske 10 µl 0,5 M EDTA damlatılmıştır. |
| 4: Boş diske 10 µl 0,1 M EDTA damlatılmıştır. |
| 5: IMP diskine 10 µl 0,5 M EDTA damlatılmıştır. |
| 6: IMP diskine 10 µl 0,1 M EDTA damlatılmıştır. |
| 7: IMP diski |
| 8: Boş diske 10 µl 0,1 M EDTA damlatılmıştır. |

Şekil 3-1: Metalo beta laktamaz enzimlerinin saptanması için imipenem ve EDTA disklerinin yerleşimi

3.6. İzoelektrik Nokta Tayini (Isoelectric Focusing, IEF)

İzolatin içerdiği beta laktamazların saptanması amacıyla IEF yöntemi kullanılmıştır. IEF yönteminde farklı pI (isoelectric point) değerlerine sahip enzimler poliakrilamid jel üzerinde elektrik akımının etkisiyle moleküler ağırlıklarına göre farklı mesafeler katederler. Daha sonra kromojenik bir substrat olan nitrosefinin kullanılmasıyla enzimler görünür hale gelirler. IEF, Matthew ve ark.'na (41) ait yöntemin modifikasyonu ile yapılmıştır. Bu amaçla triptik soy agardaki (TSA) (Oxoid, Basingstone, İngiltere) besiyerinde üretilen bakteri kültürlerinden 3-4 koloni alınarak 45 ml triptik soy buyyon içinde (Oxoid, Basingstone, İngiltere) yapılan bakteri süspansiyonu çalkalamalı etüvde 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürleri +4°C'de 4000 rpm'de 30 dakika santrifüjde çevrilerek üst sıvıları atılmış, bakteri çözeltileri 750 µl % 1'lik glisin (Merck, Almanya) içinde süspansiyon edilmiş ve bu süspansiyonlar sonikatör cihazı içindeki (Elmasonic S, Almanya) +4°C'de su banyosunda 10 dakika sonike edilerek bakteri hücreleri parçalanmıştır. Daha sonra sonikatlar 14.000 rpm'de, +4°C'de 30 dakika santrifüjde çevrilmiş, beta laktamaz enzimlerini içeren üst sıvıları alınmış ve -70°C'de saklanmıştır.

IEF için Poliakrilamid Jelin Hazırlanması: 9.5 ml distile su, 2 ml gliserin (%87) (Sigma, ABD), 4.3 ml akrilamid solüsyonu (Sigma, ABD), 1 ml amfolen (pH 3.5-9) (Sigma, ABD), 500 µl %5 TEMED (Merck, Almanya), 0.01 gr/ml'lik amonyum peroksidisulfattan (Merck, Almanya) 425 µl olacak şekilde jel hazırlanmıştır. Mini IEF

Cell (Bio-Rad, ABD) düzeneği yardımıyla 0.6 mm kalınlığında jel dökülmüş ve oda ısısında katılaşıncaya kadar bekletilmiştir. Jelin anot tarafına aplikatör strip yerleştirilmiştir. Beta laktamaz içeren üst sıvılardan ikişer mikrolitre aplikatörün kuyucuklarına damlatılmıştır. Enzim ekstraları amfolenli poliakrilamid jellerde [Model 111 MINI IEF Cell (Bio-Rad, ABD) cihazında] birinci aşamada 100 V, 6 mA, 5 W 15 dakika; ikinci aşamada 100 V, 6 mA, 5 W 15 dakika; üçüncü aşamada 450 V, 4 mA, 5 W 60 dakika olacak şekilde yürütülmüştür. Bantları görüntülemek üzere jelin üzerine % 0.03'lük nitrosefin (Calbiochem, Darmstadt, Germany) çözeltisi emdirilmiş filtre kağıdı kapatılmış ve bantlar görünmeye başlayınca filtre kağıdı kaldırılmıştır. Kırmızı olarak gözlenen beta laktamaz bantlarının anoda olan uzaklıkları logaritmik kağıda işaretlenmiştir. İzoelektrik noktalar (pI) referans proteinler (IEF standarts Bio-Rad, ABD) ve daha önceden pI değerleri bilinen enzimler ile karşılaştırılarak saptanmıştır (Tablo 3-1).

Tablo 3-0-1: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Bilinen pI Değerleri (97)

TEM türevi	5.2- 6.5
TEM-1	5.4
TEM-8	5.6
SHV türevi	7.0-8.2
SHV-3	7.0
CTX-M türevi	7.6-9.0
OXA-2 türevi	7.7-8.7
OXA-2	7.7
OXA-15	8.7
OXA-32	7.7
OXA-10 türevi	6.1-7.6
OXA-10	6.1
OXA-11	6.4
OXA-14	6.2
OXA-16	6.2
OXA-17	6.1
OXA-19	7.6
PER-1	5.3
GES türevi	5.8-7.0
GES-1	5.8
GES-2	5.8
IBC türevi	5.8-6.9
IBC-1	6.9
IBC-2	5.8
VIM-1	5.1
IMP-1	9.0
IMP-2	8.1
Kromozomal AmpC	>9.0

3.7. Bioassay ile Karbapenemaz Varlığının Saptanması

Bioassay ile karbapenem hidrolize eden enzim varlığı araştırılacak suşların önce IEF yönteminde tarif edildiği gibi sonikasyon ile sahip oldukları enzimler elde edilmiştir (98).

- 45°C’de 25-30 dakika bekletilmiş 40 ml MHA besiyerinin içine, 2 ml MHB besiyerinde 0,3 Mc Farland ($0,9 \times 10^8$ cfu/ml) bulanıklığında süspanse edilmiş *Micrococcus luteus* ilave edilmiştir. Belirgin sarı pigmenti ve karbapenemlere duyarlı olması nedeni ile *M.luteus* kullanılmıştır.
- Besiyeri iki petriye dökülerek katılaşması için 30 dakika bekletilmiştir.
- Steril bir cam pipet yardımı ile petrilere 7 mm çapında 6 kuyucuk açılmıştır.
- İmipenem (0,8 µg/ml) ve meropenem (8 µg/ml) ayrı ayrı 10’ar ml fosfat tamponlu suda (pH: 7.2) çözündürülmüştür.
- Enzimler ependorf tüplerine alınmış; bir seri +4°C’de bir saat, diğer seri ise inaktive olmaları için 96°C’de bir saat bekletilmiştir. Tüpler santrifüjde 10,000 rpm’de 5 dakika çevrilmiştir.
- Yeni ependorf tüpleri içine 100 µl enzim + 100µl imipenem (son konsantrasyon 0,4 µg/ml) ve 100 µl enzim + 100 µl meropenem (son konsantrasyon 4 µg/ml) hazırlanmıştır.
- Ependorflar vorteksle hızla karıştırılarak tüpler bir saat 37°C’de inkübe edilmiştir.
- Her enzim ve antibiyotik karışımından petrilere açılmış olan kuyucuklara 75’er µl konmuştur.
- Petrilere 37°C’de bir gece bekletildikten sonra oluşan inhibisyon zonları okunmuştur.
- 96 °C’de bir saat bekletilen enzimler inaktive olur ve damlatıldıkları kuyucukların çevresinde antibiyotiğin etkisini hidrolize edemez. Bu nedenle *M.luteus* üreyemeyeceği için bu durumda inhibisyon zonu oluşması beklenmektedir (negatif sonuç). +4 °C’de bekletilen enzimlerde ise inaktivasyon oluşmadığı için antibiyotiğin etkisi enzimin varlığında kaybolur. Bu durumda zon oluşmaması beklenmektedir (pozitif sonuç).

3.8. Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemiyle İncelenmesi

Disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle en az üç antibiyotik grubuna dirençli olduğu için çoğul dirençli olarak kabul edilen *P.aeruginosa* suşlarının PCR yöntemiyle TEM, SHV, OXA-2, OXA-10, PER-1, VEB, GES/IBC, IMP, VIM ve SPM-1 direnç genleri içerip içermedikleri araştırılmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi saptamak için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır (99-108).

Kullanılan Oligonukleotid Primerleri: Bu çalışmada TEM, SHV, OXA-2, OXA-10, PER-1, VEB, GES/IBC, IMP, VIM ve SPM-1 enzimlerine ait primerler kullanılmıştır. OXA tipi GSBL enzimleri genel olarak OXA-2 ve OXA-10 türevleri olduğu için OXA-2 (*bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-15}) ve OXA-10 (*bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-11}, *bla*_{OXA-14}, *bla*_{OXA-16}, *bla*_{OXA-17}, *bla*_{OXA-19}) gruplarına yönelik ortak primerler kullanılarak bu grup enzimlerin varlığı araştırılmıştır. GES/IBC ortak primeri olarak GES-C ve GES-D [*bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2}, *bla*_{IBC-1} (*bla*_{GES-7}), *bla*_{IBC-2} (*bla*_{GES-8})] (97), GES-2 primeri olarak GES-CASA ve GES-CASB; VIM-7 ve VIM-12 dışındaki VIM enzimleri için ortak primer olarak VIM-1L, VIM-1R (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-4}, *bla*_{VIM-5}, *bla*_{VIM-11a}) VIM-2L ve VIM-2R (*bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-3}, *bla*_{VIM-6}, *bla*_{VIM-8}, *bla*_{VIM-9}, *bla*_{VIM-10}, *bla*_{VIM-11b}); IMP ortak primeri olarak IMP-A ve IMP-B (*bla*_{IMP1-21}) kullanılmıştır.

TEM-A	5'-ATAAAATTCTTGAAGAC-3'
B	5'-AAAATCTCAAGGATCTT-3'
SHV- F	5'-TCAGCGAAAAACACCTTS-3'
R	5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3'
OXA-2-A	5'-GGAAAAGTCCATGGCAATCCGAATCTT-3'
2-B	5'-TTATCGCGCAGCGTCCGAGTT-3'
OXA-10-A	5'-TATCGCGTGTCTTTTCGAGTA-3'
10-B	5'-TTAGCCACCAATGATGCCC-3'
PER-1-A	5'-GGGACAATCGGATGAATGTCA-3'
1-B	5'-GGCGGCTTAGATAGTGCTGAT-3'
VEB-1-A	5'-CGACTTCCATTTCCCGATGC-3'
1-B	5'-GGACTCTGCAACAATAACGC-3'
GES-C	5'-GTTTTGCAATGTGCTCAACG-3'
D	5'-TGCCATAGCAATAGGCGTAG-3'
GES-CASA	5'-ACAAAGATAATTTCCATCTCAAGGGAT-3'
CASB	5'-GTTTTAGACGGGCGTCAACT-3'

IMP-1A	5'-ATGAGCAAGGTTATCCTTATTC3'
1B	5'-GCTGCAACGACTTGTTAG-3'
IMP-A	5'-GCGCATCTCCAAGACCATG-3'
B	5'GCCACGCGATTTGACGGAG-3'
VIM-2A	5'-TTATGGAGCAGCAAGCAGTG-3'
2B	5'-CGAATGCGCAGCACCAGG-3'
VIM-1-R	5'-CTACTCGGCGACTGAGCGAT-3'
1-L	5'-ATGTTAAAAGTTATTAGTAGT-3'
VIM-2-R	5'-CTACTCAACGAACTGAGCGAT-3'
2-L	5'-ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG-3'
SPM-1-A	5'-CTGCTTGGATTCATGGGCGC-3'
1-B	5'-CCTTTTCCGCGACCTTGATC-3'

RAPD-PCR'da ERIC-2 primeri kullanılmıştır.

ERIC-2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Primerlerin Hazırlanışı: Ticari olarak satın alınan primerler (Bio Basic Inc., Kanada) liyofilize halde bulunmaktadır. Sulandırma işlemi, protokolüne uygun olarak yapılmış ve 100 pM'lük konsantrasyonlar elde edilmiştir. Daha sonra kullanılacak primere göre 5 (100 pM'den 5 µl + 95 µl distile su) ya da 10 pM (100 pM'den 10 µl + 90 µl distile su) olacak şekilde tekrar sulandırılmış, ependorf tüplerine bölünmüş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Taq Polimeraz (Bio Basic Inc., Kanada): Konsantrasyonu 5 U/µl oranındadır.

dNTP Karışımı (Deoksi Nükleotid Trifosfatlar= dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Bio Basic Inc., Kanada): Her biri 100 mM konsantrasyonda hazır çözelti olarak satın alınmıştır. Her birinden 2 µl alınarak bir tüpe konmuş ve üzerine 92 µl distile su eklenerek son konsantrasyonun 2 mM olması sağlanmış, küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır.

MgCl₂ Solüsyonu (Bio Basic Inc., Kanada): Hazır olarak elde edilen 25 mM konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonu, ayrıca sulandırım yapmadan son konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde uygun miktarda reaksiyon karışımına eklenmiştir. $m_1.v_1=m_2.v_2$ formülü kullanılarak, alınacak hacim hesaplanmıştır.

DNA Marker: DNA marker olarak ΦX174 DNA Hae III digest kullanılmıştır (Takara, Japonya).

0,5 M EDTA'nın (Sigma, ABD) Hazırlanışı: 1 litre distile su içerisinde ana çözelti 0.5 M olarak hazırlanmıştır. 186.1 gr disodyum etilendiamintetraasetat $2H_2O$ 'ya (EDTA) karşılık yaklaşık 20 gr NaOH tartılarak hem EDTA'nın çözülmesi, hem de pH'nın 8.0'e ulaşması sağlanmıştır.

1xTBE Tampon Solüsyonunun Hazırlanışı (pH:8.3):

1 litre için

10.77 gr Tris (89 mM)

5.502 gr Borik asit (89 mM)

Stok 0.5 M EDTA (2.5 mM)'dan 5 ml alınmıştır.

0.5 x TBE hazırlamak için eşit hacim 1x TBE tampon solüsyonu ile distile su karıştırılmıştır.

Etidyum Bromür (Sigma, ABD): 10 mg/ml olarak hazırlanır. Distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çok uzun sürede çözündürülmüş ve kullanılıncaya kadar oda ısısında ışıktan korunarak saklanmıştır.

Yükleme Tamponu

0.25 gr bromfenol mavisi (Sigma, ABD)

30 ml gliserol

70 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanan tampon $+4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

%1'lik Agaroz Jelin Hazırlanması (Sigma, ABD): Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz (örn 50 ml için 0.5 gr agaroz) 0.5x TBE tampon solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürülmüştür. Hazırlanan jel, sıcaklığı $50-55^{\circ}C$ 'ye ayarlanmış su banyosunda 10-15 dakika bekletildikten sonra 0.5 $\mu g/ml$ ($5\mu l$) etidyum bromür ilave edilerek boyanmıştır. Jel, kenarları kapatılmış jel kaseti üzerine, sızıntı olmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice uzaklaştırılmış ve jel elektroforez tankına geçirilmiştir.

DNA Ekstraksiyonunun Hazırlanması: Suşlardan alınan 1-2 koloni içinde 900 μl distile su bulunan ependorf tüplerinde süspanse edilmiştir. Ependorflar içinde

kaynar su bulunan bir haznenin içine yerleştirilip 10 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra 8000 rpm.'de 10 dakika santrifüjde çevrilmiş ve üst sıvı alınıp -70°C 'de saklanmıştır.

Amplifikasyon Karışımının Hazırlanması: Amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 μl olacak şekilde, aşağıda gösterildiği gibi hazırlanmış ve reaksiyon çözeltisinde süspanse edilmiştir.

Distile su	24 μl
PCR tampon (10x)	5 μl
25 mM MgCl_2	5 μl
2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 μl
10 pM primer (her birinden)	2 μl
5 U Taq DNA polimeraz	1 μl
DNA ekstraksiyonu	1 μl

Amplifikasyon Programı

94°C'de 5 dakika lizis ve denatürasyon

95°C'de 45 saniye denatürasyon

56°C'de 45 saniye primer bağlanması

72°C'de 1 dakika primer uzaması

} 35 döngü

35 döngü sonunda 72°C'de 7 dakika olacak şekilde tüpler Thermal Cyclers'a (Biometra, Almanya) yerleştirilmiş ve 35 döngü sonunda PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile aşağıda tarif edildiği gibi analiz edilmiştir.

Amplifikasyon Sonucunun Gözlenmesi: 10 μl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 μl brom fenol mavisi ile karıştırılmış, %1 0.5xTBE tampon ile hazırlanmış ve 10 μM etidyum bomür çözeltisi ile boyanmış jelde 150 V'da bir saat boyunca elektroforez akımında yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~304 nm) altında fotoğrafı çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, molekül ağırlık standardı (Φ 174DNA size marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlenmiştir.

RAPD-PCR Amplifikasyon Programı:

94 °C’de 5 dakika lizis ve denatürasyon

94 °C’de 1 dakika denatürasyon

36 °C’de 1 dakika primer bağlanması

72 °C’de 3 dakika primer uzaması

} 35 döngü

35 döngü sonunda 72 °C’de 7 dakika olacak şekilde tüpler Thermal Cyclar’a (Biometra, Almanya) yerleştirilmiş ve 35 döngü sonucunda PCR ürünleri %1,5’lik agaroz jel elektroforezi ile 150 V’da bir saat yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir translüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~304) altında fotoğrafı çekilip ortaya çıkan bantların profilleri karşılaştırılmıştır (99).

4. BULGULAR

Yapılan disk difüzyon ve agarda dilüsyon deneylerinin sonucunda 50 *P.aeruginosa* suşunun 31'i (%62) piperasiline, 38'i (%76) tikarsiline, 33'ü (%66) tikarsilin+klavulanik aside, 42'si (%84) meropeneme, 42'si (%84) imipeneme, 40'ı (%80) seftriaksona, 50'si (%100) seftazidime, 32'si (%64) sefoperazona, 32'si (%64) sefepime, 48'i (%96) aztreonama, 21'i (%42) siprofloksasine, 44'ü (%88) gentamisine ve 34'ü (%68) tobramisine dirençli bulunmuştur. Tüm suşların MİK değerleri Tablo-1'de gösterilmiştir.

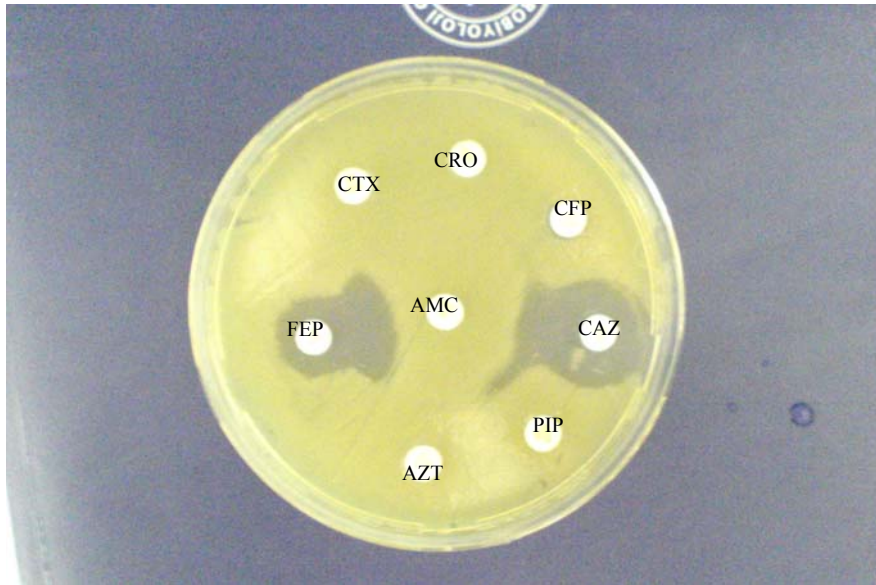
Tablo 4-1: Agarda Dilüsyon Deneyi Sonucunda Elde Edilen MİK Değerleri (µg/ml)

	TIC	TIC+CLA	MEM	IMP	PIP	CRO	CAZ	CFP	FEP	AZT	CIP	GEN	TOB
1	1024-R	1024-R	512-R	64-R	512-R	256-R	128-R	256-R	64-R	512-R	8-R	256-R	32-R
2	1024-R	1024-R	64-R	128-R	256-R	1024-R	128-R	1024-R	1024-R	32-R	4-R	1024-R	2-S
3	256-R	256-R	16-R	16-R	256-R	256-R	128-R	128-R	32-R	512-R	32-R	128-R	0,125-S
4	128-R	128-R	64-R	256-R	256-R	128-R	128-R	32-R	4-R	≥1024-R	0,03-R	≥1024-R	256-R
5	1024-R	512-R	512-R	128-R	≥512-R	128-R	512-R	≥1024-R	128-R	32-R	32-R	1024-R	0,125-S
6	512-R	512-R	64-R	64-R	512-R	256-R	64-R	1024-R	64-R	512-R	1-R	512-R	64-R
7	1024-R	1024-R	64-R	16-R	512-R	256-R	64-R	256-R	64-R	512-R	16-R	128-R	1-S
8	128-R	64-S	16-R	64-R	64-S	128-R	64-R	16-S	64-R	512-R	16-R	1024-R	32-R
9	256-R	256-R	2-S	2-R	256-R	256-R	256-R	256-R	128-R	512-R	4-R	1024-R	0,06-S
10	512-R	512-R	256-R	16-R	256-R	512-R	32-R	1024-R	1024-R	32-R	4-R	512-R	0,125-S
11	512-R	512-R	16-R	128-R	256-R	128-R	32-R	256-R	64-R	128-R	16-R	1024-R	64-R
12	256-R	256-R	16-R	16-R	256-R	128-R	32-R	256-R	64-R	512-R	16-R	512-R	1-S
13	256-R	64-S	1-S	2-S	16-S	128-R	128-R	16-S	64-R	512-R	1-S	128-R	0,25-S
14	128-R	64-S	64-R	16-R	64-S	128-R	32-R	16-S	64-R	512-R	16-R	1024-R	1-S
15	512-R	512-R	16-R	16-R	256-R	128-R	32-R	256-R	64-R	128-R	4-R	1024-R	32-R
16	1024-R	1024-R	16-R	16-R	256-R	1024-R	64-R	64-R	256-R	512-R	1-S	1024-R	0,03-S
17	256-R	256-R	64-R	16-R	256-R	256-R	32-R	128-R	128-R	512-R	4-R	512-R	0,25-S
18	1-S	0,5-S	4-S	64-R	512-R	32-S	32-R	1024-R	1-S	512-R	8-R	512-R	0,25-S
19	256-R	128-R	16-R	0,5-S	128-R	256-R	64-R	256-R	64-R	512-R	4-R	1024-R	0,25-S
20	1024-R	128-R	16-R	4-S	128-R	256-R	32-R	256-R	256-R	512-R	1-S	1024-R	2-S
21	256-R	256-R	16-R	16-R	128-R	128-R	64-R	128-R	64-R	512-R	4-R	512-R	32-R
22	128-R	128-R	64-R	512-R	512-R	128-R	512-R	512-R	64-R	≥1024-R	32-R	≥1024-R	512-R
23	128-R	32-S	2-S	16-R	64-S	128-R	128-R	256-R	16-S	512-R	4-R	128-R	64-R
24	128-R	128-R	0,125-S	16-R	32-S	1024-R	32-R	16-S	64-R	512-R	8-R	512-R	64-R
25	256-R	256-R	64-R	512-R	256-R	64-R	512-R	128-R	64-R	≥1024-R	32-R	≥1024-R	256-R
26	32-S	32-S	32-R	32-R	256-R	256-R	128-R	256-R	0,125-S	512-R	4-R	256-R	128-R
27	8-S	8-S	16-R	16-R	8-S	32-S	128-R	4-S	2-S	32-R	0,03-S	64-R	128-R
28	4-S	8-S	16-R	16-R	16-S	256-R	128-R	4-S	64-R	128-R	0,03S	256-R	128-R
29	128-R	32-S	16-R	4-S	16-S	32-S	128-R	16-S	16-S	512-R	0,015-S	32-R	128-R
30	512-R	512-R	64-R	512-R	128-R	1024-R	512-R	128-R	256-R	≥1024-R	64-R	1024-R	256-R
31	8-S	8-S	16-R	2-S	64-S	128-R	128-R	8-S	4-S	4-S	4-R	512-R	32-R
32	128-R	128-R	64-R	32-R	512-R	1024-R	128-R	128-R	64-R	512-R	4-R	256-R	0,06-S
33	128-R	128-R	16-R	32-R	512-R	512-R	128-R	256-R	16-S	512-R	0,06-S	4-S	0,125-S
34	8-S	8-S	64-R	32-R	8-S	128-R	128-R	8-S	0,125-S	32-R	0,03-S	128-R	64-R
35	8-S	8-S	16-R	32-R	16-S	128-R	128-R	2-S	4-S	32-R	0,015-S	256-R	128-R
36	128-R	128-R	16-R	32-R	16-S	128-R	128-R	2-S	4-S	4-S	0,06-S	128-R	64-R
37	256-R	256-R	64-R	128-R	128-R	1024-R	512-R	128-R	128-R	≥1024-R	32-R	≥1024-R	256-R
38	512-R	512-R	64-R	64-R	32-S	1024-R	128-R	8-S	256-R	64-R	0,25-S	2-S	64-R
39	1024-R	512-R	256-R	2-S	256-R	32-S	128-R	256-R	4-S	256-R	0,25-S	32-R	128-R
40	128-R	128-R	128-R	64-R	512-R	1024-R	512-R	128-R	128-R	≥1024-R	32-R	≥1024-R	256-R
41	256-R	128-R	128-R	128-R	512-R	1024-R	512-R	128-R	128-R	1024-R	16-R	256-R	128-R
42	128-R	128-R	32-R	32-R	16-S	32-S	32-R	2-S	0,125-S	64-R	0,015-S	32-R	256-R
43	128-R	128-R	64-R	32-R	32-S	32-S	128-R	1-S	1-S	64-R	0,03-S	0,125-S	128-R
44	1024-R	512-R	4-S	32-R	256-R	16-S	128-R	128-R	128-R	64-R	1-S	512-R	128-R
45	4-S	4-S	4-S	64-R	128-R	16-S	128-R	64-R	4-S	64-R	0,03-S	4-S	32-R
46	4-S	4-S	32-R	2-S	4-S	8-S	128-S	1-S	128-R	64-R	0,06-S	64-R	64-R
47	512-R	512-R	0,125-S	32-R	16-S	128-R	128-R	256-R	8-S	512-R	8-S	1-S	64-R
48	0,5-S	0,5-S	64-R	128-R	0,06-S	128-R	128-R	2-S	0,25-S	64-R	0,03-S	0,06-S	32-R
49	32-S	4-S	32-R	32-R	256-R	4-S	128-R	8-S	2-S	64-R	0,06-S	512-R	128-R
50	0,25-S	0,25-S	32-R	2-S	2-S	128-R	64-R	0,25-S	1-S	32-R	0,015-S	32-R	128-R
EC 35218	4	16	0,125	0,5	2	0,125	4	0,25	0,03	0,06	0,03	0,125	0,5
EC 25922	4	4	0,06	0,25	4	0,06	0,5	0,25	0,06	0,125	0,015	0,25	0,5
PA 27853	16	16	1	2	8	16	2	4	4	8	0,5	2	1

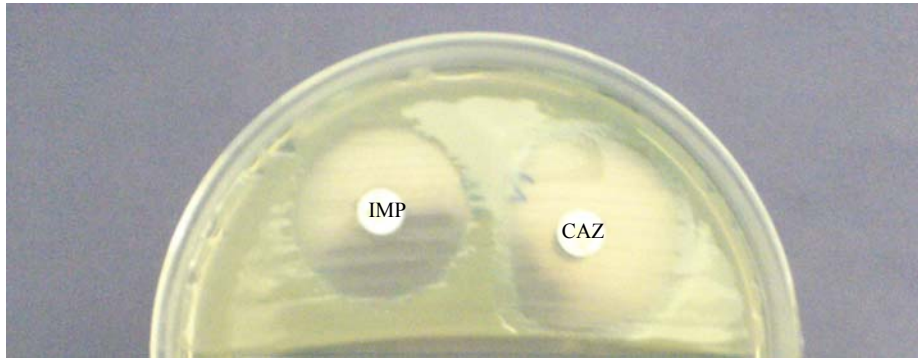
Tablo 4-2: Agarda dilüsyon deneyi sonuçlarına göre MİK değerlerinin kümülatif dağılımı

Antibiyotikler	MİK (µg/ml)																	MİK 50	MİK 90	
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024			>1024
TIC					1	1	1		3	4		2		13	10	7	8		128	512
TIC+CLA					1	2			3	5		3	3	12	7	10	4		128	512
MEM				2			1	2	3		16	6	14	2	2	2			32	128
IMP						1		6	2		13	11	7	6	1	3			32	128
PIP			1					1	1	1	8	3	4	6	15	10			128	512
CRO									1	1	2	6	1	18	10	2	9		128	1024
CAZ											10	7	25	2	6			128	512	
CFP					1		2	4	2	4	5	1	2	14	9	1	4	1	128	1024
FEP				3	1		3	2	5	2	3	1	17	7	4		2		64	256
AZT					1		1	1	2	1		6	5	4	1	21	1	6	512	>1024
CIP	4	7		4	2		5		11	6	4	6	1						4	32
GEN			1	1			1	1	2			4	2	6	6	10	11	5	512	>1024
TOB		1	2	4	4		3	2				7	9	11	6	1			64	256

Çift disk sinerji yöntemiyle dokuz (%18) suшта GSBL varlığı saptanmış; onaltı (%32) suшта ise kromozomal AmpC enziminin indüklendiği görülmüştür (Şekil 4-1, Şekil 4-2).

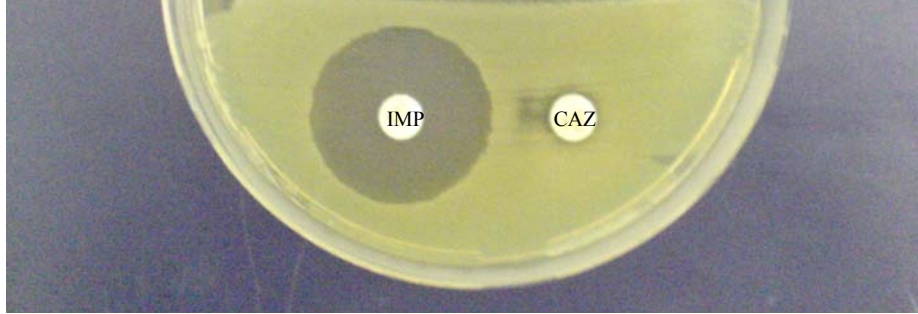


Şekil 4-1: Çift disk sinerji yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) pozitifliği



Şekil 4-2: İndüklenebilir kromozomal AmpC enzimi (İBL) pozitifliği

Kloksasilinli MHA'da yapılan deney sonunda dört (%8) suшта GES tipi enzim pozitifliği saptanmıştır (şekil 4-3).



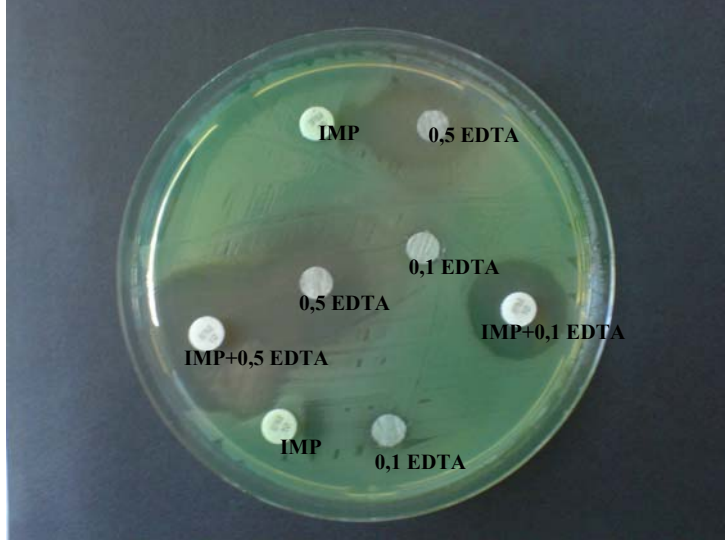
şekil 4 -3: GES tipi enzimler için modifiye edilmiş çift disk sinerji testinde pozitif sinerji

E-test ile 14 (%28) suşta imipenem: imipenem+EDTA MİK oranları ≥ 8 olarak bulunmuş ve MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir (şekil 4-4).



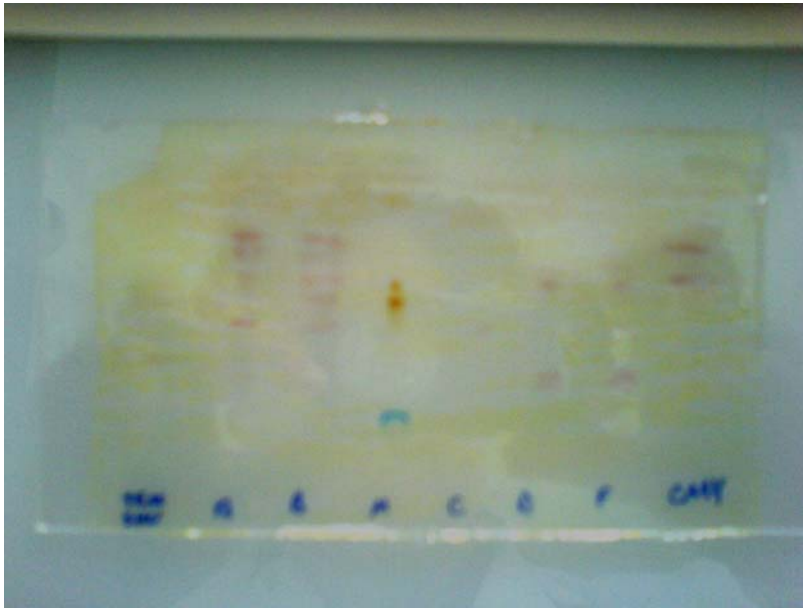
şekil 4- 4: İmipenem/imipenem+EDTA'lı E-test ile MBL pozitifliği

0,5 M EDTA'lı disk ve imipenem diskiyle yapılan çift disk sinerji testiyle 12 (%24), kombine disk testiyle ise 26 (%52); 0,1 M EDTA'lı disk ve imipenem diskiyle yapılan çift disk sinerji testiyle bir (%2), kombine disk testiyle ise iki (%4) suşta MBL pozitifliği saptanmıştır (şekil 4-5).



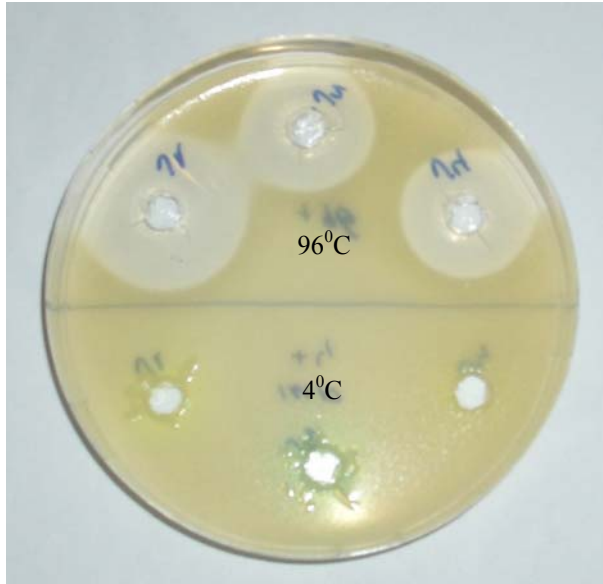
Şekil 4-5: EDTA ile MBL pozitifliği

İzoelektrik nokta tayini (IEF) deneyleri sonucunda bulunan pI değerleri tablo-2'de IEF yöntemiyle saptanan bantlar şekil 4-6'da gösterilmiştir. Elde edilen pI değerleri 4.5 ile 8.2 arasında değişmektedir.



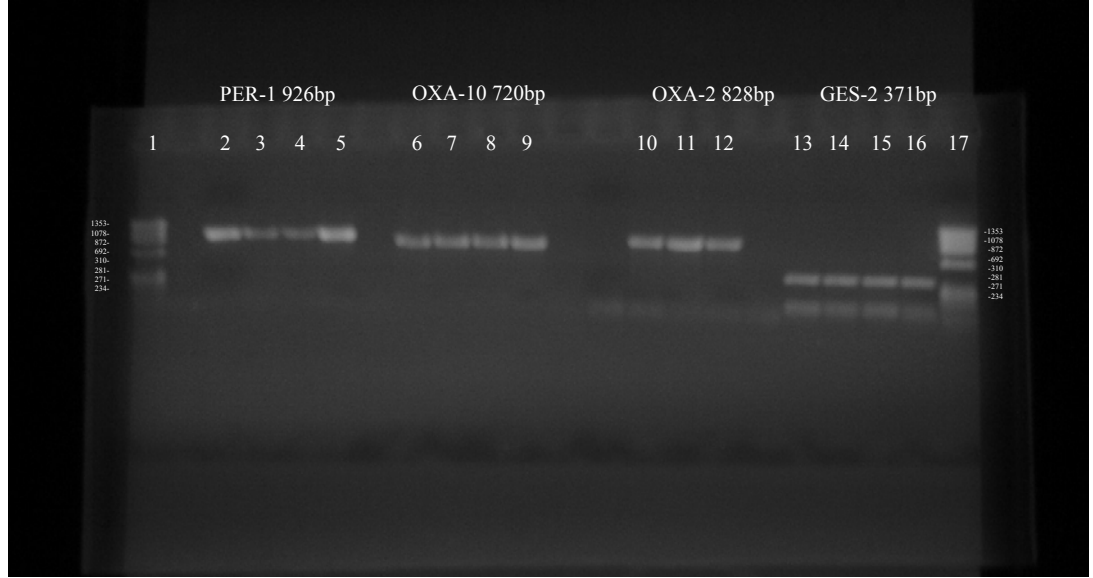
Şekil 4-6: İzoelektrik nokta tayini (IEF) yöntemiyle görüntülenen beta laktamaz enzim bantları

Bioassay deneylerinin sonucunda on (%20) suşun karbapenemleri hidrolize eden enzimlere sahip oldukları, bunlardan üçünün (%6) hem imipenemi hem de meropenemi hidrolize ettiği saptanmıştır. Şekil 4-7’de bioassay deneylerinin sonuçlarına ait bir örnek gösterilmiştir. Şeklin üst kısmında üç ayrı enzim örneğinin 96°C’de bekletilerek inaktive olmuş halde karbapenemlere etki etmedikleri ve bu nedenle inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmektedir. Şeklin alt kısmında ise aynı enzimlerin 4°C’de inaktive olmadığı durumda, karbapenemaz enzimlerinin karbapenemi hidrolize etmesi nedeniyle zon oluşmadığı görülmektedir.



Şekil 4 -7: Karbapenemaz araştırması için bioassay deneyi

PCR deneyleri sonucunda 22 (%44) suшта PER-1, 43 (%86) suшта GES/IBC, 23 (%46) suшта OXA-10 türevi ve 14 (%28) suшта OXA-2 türevi GSBL enzimi izole edilmiştir ancak MBL tipi enzimlere raslanmamıştır. Suşlara göre GSBL enzimlerinin dağılımı tablo-4’de gösterilmiştir. Bir (%2) suş PER-1, GES/IBC türevi, OXA-10 türevi ve OXA-2 türevi; sekiz (%16) suş PER-1, GES/IBC ve OXA-10 türevi ve sekiz (%16) suş PER-1, GES/IBC ve OXA-2 türevi enzimlerini bir arada içermektedir. TEM, SHV, VEB, IMP ve VIM enzimleri negatif bulunmuştur. PCR deneyleri sonucunda oluşan bantlar şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: PCR deneyleri sonucunda görüntülenen bantlar kolon 1: marker, kolon 2-5: PER-1, kolon 6-9: OXA-10, kolon 10-12: OXA-2, kolon 13-16: GES-2, kolon 17: marker

RAPD-PCR analizleri sonucunda suşların onsekiz farklı profile sahip oldukları gözlenmiştir. Profillere göre suşların dağılımı tablo-3'te gösterilmiştir.

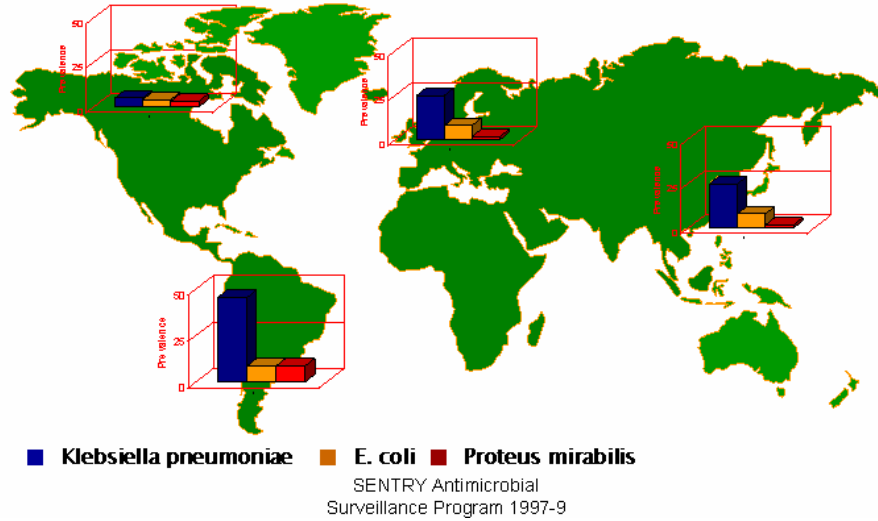
Tablo 4-3: RAPD-PCR profillerine göre suşların dağılımı

Profil No	Örnek No	Profil No	Örnek No
1-	1, 2	10-	14, 30
2-	3	11-	16, 19, 45
3-	4, 11	12-	17, 20
4-	5, 6, 12, 15, 23	13-	18, 25
5-	7, 27, 36, 37, 40, 44, 47, 49	14-	22, 24, 34
6-	8, 31, 50	15-	26, 32, 33, 35, 46
7-	9, 21, 28	16-	38
8-	10	17-	39
9-	13, 29	18-	41, 42, 43, 48

En sık raslanan profil 5 no.lu profildir. Bu profile ait sekiz suştan dördü Çocuk Enfeksiyon, ikisi ise YDYB hastalarına aittir. 4 no.lu profile ait beş suştan üçü Erişkin Yoğun Bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilmiştir. 15 no.lu profile ait beş suştan üçü Çocuk Enfeksiyon servisinde yatan hastalara ait iken diğer iki suş da yine Çocuk Gastroenteroloji ve YDYB hastalarına aittir. 18 no.lu profile ait dört suşun tümü Çocuk Enfeksiyon servisinde yatan hastalardan izole edilmiştir. 6 no.lu profile ait üç suşun tümü Erişkin Yoğun Bakım ünitesi hastalarına ait suşlardır.

5. TARTIŞMA

Özellikle hastanelerde artan antibiyotiklere dirençli bakteriler sorunuyla başedebilmek için, temel sefalosporin molekülünde minör değişiklikler yapılarak beta laktamaza dayanıklı geniş spektrumlu sefalosporinler geliştirilmiş ve 1980'lerin başlarında kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan ilk kullanılan sefotaksimdir ve bunu seftriakson ile seftazidim takip etmiştir. 1980'lerin ortalarından itibaren gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. GSBL'ler daha dar spektrumlu olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden köken almışlardır (54,109). Beta laktam antibiyotiklerin kullanım prensiplerindeki farklılıklara bağlı olarak beta laktamazların prevalansı ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hatta hastaneden hastaneye değişmektedir (31). Dünyanın hemen hemen her bölgesinde GSBL üretimi en yaygın olarak *K.pneumoniae* izolatlarında görülmektedir (110).



Şekil 5-1: Dünyada GSBL enzimlerinin dağılımı (110)

P.aeruginosa, özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere hastane enfeksiyonu etkeni olarak en sık izole edilen patojenlerden biridir. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyallere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranlara ulaşması önemli bir sorundur (111). *P.aeruginosa*, sadece sınırlı sayıda antibiyotiğe hassasiyet gösteren virulan bir mikroorganizmadır ve antibiyotik direnci gittikçe artan bir problem olmaya başlamıştır (98,112). Çoğul dirençli *P.aeruginosa* nozokomiyal

enfeksiyonları tüm dünyada yaygınlaşmaktadır. MBL ve GSBL'lerin varlığı ile birçok antibiyotiğe direnç gelişmekte ve bu izolatlarla enfekte hastaların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmaktadır (69,87).

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 (87).

Pseudomonas izolatlarında GSBL enzimleri dünyanın her bölgesinden bildirilmekte, ancak enzimlerin türleri ve yoğunlukları bölgelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin PER-1'e en yoğun olarak Türkiye'de rastlanırken, GES tipi enzimlere Fransa, Yunanistan ve Uzak Doğu'da rastlanmaktadır. OXA türevi enzimler ise Türkiye'den ve dünyanın değişik bölgelerinden sıklıkla bildirilmektedir. MBL enzimlerinden IMP türevlerine en sık Uzak Doğu'da, VIM türevlerine ise en sık Avrupa ve Güney Amerika'da olmakla birlikte tüm dünyada rastlanılmaktadır. Bununla birlikte SPM-1 Brezilya'da yayılırken, GIM-1 Almanya'dan ve SIM-1 Güney Kore'den bildirilen birer suşla sınırlı kalmıştır (84,94).

Uluslararası SENTRY çalışmasının Avrupa biriminin 1997-1998 yıllarında yaptığı araştırmaya göre 5000 GSBL pozitif Enterobacteriaceae izolatının %10'u Türkiye, İsrail, Yunanistan ve İtalya'dan izole edilmiştir. Bu çalışmaya göre Türkiye %23.8 GSBL pozitifliğiyle ilk sırada yer alırken Türkiye'yi %13.9'la İsrail, %12.6'yla Yunanistan, %11.9'la İtalya ve %10'la Portekiz takip etmektedir. Avrupa ülkeleri arasında en düşük GSBL pozitifliği %7 ile Avusturya ve İsviçre'dedir, Arnavutluk'tan ise GSBL bildirim bulunmamaktadır (113).

PER-1 çoğunlukla Türkiye'de, PER-2 Güney Amerika'da, VEB-1 Vietnam ve Tayland'da yaygındır (50,114). PER-1 ilk olarak Fransa'da bir Türk hastaya ait *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiş, daha sonra Türkiye ve İtalya'da *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.'de bulunmuştur(68). Vahaboğlu ve ark. (70) Türkiye'nin yedi coğrafik bölgesinde lokalize olan sekiz farklı üniversite hastanesinden üç aylık bir periyotta 72 *Acinetobacter* spp., 92 *Klebsiella* spp. ve 367 *P.aeruginosa* olmak üzere toplam 531 izolatla yürüttükleri çalışmanın sonucunda *Acinetobacter* spp.'lerin %76'sının, *Klebsiella* spp.'lerin %39'unun ve *P.aeruginosa*'ların %28'nin seftazidime dirençli olduğunu saptamışlardır. Seftazidime dirençli olan *Acinetobacter* spp.'lerin %60'ında ve *P.aeruginosa*'ların %38'inde PER-1 enzimi pozitif bulunmuştur. Vahaboğlu ve ark.'nın (66) 1997'de yaptıkları çalışmada 58 *Acinetobacter* spp

izolatından 36'sı (%62) PER-1 üretirken hiçbirinin OXA-10 üretmediği saptanmıştır. Aynı çalışmada 76 *P.aeruginosa* izolatından 18'inin (%23.7) PER-1, dördünün (%5.3) OXA-10 enzimini tek başına, sekiz (%10.5) izolatın ise her iki beta laktamızı bir arada ürettiği görülmüştür. Aktaş ve ark.'nın (99) yaptığı çalışmaya göre İstanbul'da Şubat 1999- Şubat 2000 tarihleri arasında yatan hasta izolatı 287 *P.aeruginosa* suşundan %39'u seftazidime dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmaya göre yoğun bakım ünitesi izolatlarında seftazidim direnci %62'dir. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen 49 suşun çoğul dirençli olduğu; %98'inin imipeneme, %92'sinin aztreonama, %96'sının sefepime, %41'inin piperasiline ve %37'sinin piperasilin-tazobaktama dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çoğul dirençli 49 izolatın tümü aminoglikozidlere ve florokinolonlara dirençli bulunmuştur. Çift disk sinerji yöntemiyle seftazidime dirençli ve çoğul dirençli 49 izolatın 18'inin (%37) klavulanik asitle inhibe olan GSBL ürettikleri saptanmıştır. PCR yöntemiyle 49 izolattan 42'si (%86) PER-1 ve 27'si (%55) OXA-10 türevi enzimler açısından pozitif bulunmuş; 20'sinin (%41) ise her iki beta laktamızı birlikte ürettiği saptanmıştır. Belçika'da Aralık 2003- Mart 2005 tarihleri arasında Fransa sınırına yakın bölgelerdeki hastanelerde yapılan çalışmada GSBL üreten sekiz *A.baumannii* izolatındaki GSBL'lerin PER-1 ve VEB-1 olduğu saptanmıştır. PER-1 üreten *A.baumannii* izolatlarından bir tanesi Türkiye'de tatil yaparken trafik kazası geçirmiş ve bu nedenle Belçika'ya geri dönmüş bir hastada bulunmuştur. Ayrıca bu hasta ile aynı yoğun bakım ünitesinde yatan başka bir hastadan da PER-1 üreten *A.baumannii* suşu izole edilmiştir (71).

Yong ve ark.'nın (68) yaptığı çalışmaya göre Güney Kore'de 2001-2002 yıllarında toplanan 97 *Acinetobacter* spp. izolatından 61'i (%62.8) seftazidime dirençli ve 53'ü (%54.6) PER-1 pozitif bulunmuş; seftazidime dirençli 181 *P.aeruginosa* izolatında ise PER-1 pozitifliğine rastlanmamıştır. Avrupa'dan coğrafik olarak uzak Kore'de PER-1 pozitif *Acinetobacter* spp.'lerin varlığı ilginç bulunmuştur. Bu durum diğer ülkelerde de PER-1 pozitif bakterilerin olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada PER-1 enzimi, tümü seftazidime dirençli olan 50 izolatın 22'sinde (%44) pozitif bulunmuştur.

OXA-10 türevi enzimlerden OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17 ve **OXA-2** türevi OXA-15 ilk olarak Ankara'da Gür ve ark. (59-63) tarafından izole edilmişlerdir.

OXA-2 ve OXA-10 türevleri GSBL tipi OXA enzimlerini genel olarak içerdiği için bu çalışmada OXA-2 ve OXA-10 türevlerine yönelik ortak primerler kullanılmış ve 23 izolatta (%46) OXA-10, 14 izolatta (%28) OXA-2 türevi GSBL enzimi pozitif bulunmuştur.

İlk GES tipi GSBL enzimi 1998 yılında Fransa'da izole edilen bir *K.pneumoniae* suşunda bulunmuştur. GES-1 Fransa'dan; GES-2 Güney Afrika'dan; GES-3, GES-4, GES-7 ve GES-8 Yunanistan'dan; GES-5 ve GES-6 Japonya'dan bildirilmiştir. GES-3 Yunanistan'dan sonra Kore'de de saptanmıştır (53,57,62,63,84). 2004 yılında Japonya'da Wachino ve ark.'nın (75) yaptığı çalışmada bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç gösteren altı *K.pneumoniae* klinik izolatında GES-3 enziminin varlığı gösterilmiştir. 2000'de Poirel ve ark.'nın (115) yaptığı çalışmada Güney Afrikada Zimbabwe'li bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* suşunda GES-2 enzimi bulunmuştur. GES tipi beta laktamazlar *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *K.pneumoniae*'nin de dahil olduğu gram negatif çomaklarda artan sıklıkta bildirilmektedir.

GES tipi enzimler *Enterobacter* cinsi bakterilerde görülen IBC tipi enzimlerle yapısal olarak büyük benzerlik taşımaktadır. GES ve IBC enzimleri, her iki grubu birlikte saptayan $bla_{GES/IBC}$ ortak primerlerinin kullanıldığı PCR deneyleriyle tanımlanmakta, ancak GES tipi ve IBC tipi enzimlerin ayrımı için mutlaka dizi analizi gerekmektedir. GES-1 ilk olarak Fransa'da bir *K.pneumoniae* suşundan izole edilmiştir. Daha sonra bla_{GES-1} geni yine Fransa'da bir *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiş ve Yunanistan'da izole edilmiş olan bla_{IBC-2} geni ile yapısal olarak ilişkili bulunmuştur. IBC-2; GES-1'den bir, IBC-1'den iki aminoasit farklılığı göstermekte; GES-2 de GES-1'den bir aminoasit farklılığı göstermektedir. Ancak GES-2, GES-1'den farklı olarak genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin yanı sıra imipenemi de hidrolize etmektedir ve karbapenemaz özelliğindedir; GES-1 ise GSBL enzimidir ve sefoksitine yüksek afinite gösterir ancak diğer GSBL enzimlerinden farklı olarak aztreonama karşı hidrolitik aktivitesi yoktur. GES-2 enzimi Güney Afrika'da yatan bir hastanın *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiş ve aynı hastanede Mart-Temmuz 2000 tarihlerinde ortaya çıkan bir salgınla ilişkili bulunmuştur. Plazmid kaynaklı bla_{GES-2} genini taşıyan aynı suş sekiz hastadan izole edilmiştir. Araştırmacılar GES-2'nin VEB ve PER-1 enzimlerinden daha yaygın olabileceği varsayımına dikkat çekmişlerdir (78).

Pseudomonas'ta bla_{GES} ve bla_{IBC} genleri kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilmektedir. Ambler Sınıf B ve Ambler Sınıf D beta laktamazları kodlayan genler genellikle Sınıf 1 integronlarda lokalizedirler (78). GES-1, GES-2, IBC-1 ve IBC-2 de Sınıf 1 integron üzerinde kodlanmaktadır (75,116).

Ülkemizde daha önce GES türevi enzimlerle yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Ancak coğrafik olarak ülkemize çok yakın olan Yunanistan'da ve turizm açısından yakın ilişkide bulunduğumuz Fransa'da bu enzim grubuna sık rastlanması nedeni ile bu çalışmaya GES/IBC türevi enzimleri araştırmak için GES/IBC primeri eklenmiştir. İlk olarak GES/IBC ortak primeri olan GES C/ GES D primerleri kullanılmış ancak sonucun 43 suşta (%86) pozitif olması şüpheli bulunup deneyler GES-2 primerleri olan GES-CASA/ GES-CASB primerleri ile tekrarlanmıştır. Bu ikinci grup primerlerle de pozitiflik oranı ilk primerlerle aynı (%86) bulunmuştur. Saptanan yüksek pozitiflik oranının dizi analizi çalışmasıyla doğrulanması gerekmektedir, fakat bu tez çalışmasında dizi analizine yer verilmemiştir.

PCR yöntemi ile GES/IBC pozitifliği saptanan 43 suşun 37'sinde (%86) imipenem direnci, 35'inde (%81) sefoksitin direnci (rutin antibiyogram sonucu) bulunmaktadır. *P.aeruginosa*'da imipenem direnci sıklıkla D₂ porin kaybına bağlı olarak gelişir, meropenem ise bu mekanizmadan birincil olarak etkilenmez (109). Bununla birlikte GES-2 enzimi de düşük düzey imipenem direncine yol açmakta fakat meropeneme etki etmemektedir (78). 18, 23, 24, 44, 45, 47 No.'lu suşlar meropeneme duyarlı, imipeneme düşük düzeyde direnç gösteren suşlardır. Bu suşlarda PCR ile saptanmış olan GES/IBC pozitifliğinin, fenotipe dayanarak, GES-2 karbapenemaz varlığına bağlı olabileceği düşünülebilir. GES/IBC pozitif bulunan 43 suştan 20'si (%46.5) izoelektrik nokta tayini ile uygun pI noktalarına (pI: 5.8, 6.9, 7.0) sahip bulunmuştur. Ayrıca kloksasilinli MHA'da imipenem ve seftazidim diskleriyle yapılan sinerji deneyiyle 13, 19, 23 ve 29 no.'lu suşlarda fenotipik olarak GES tipi GSBL pozitifliği saptanmıştır. Tüm bu veriler GES/IBC enzimlerinin ülkemizde de yaygın olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu konu ile ilgili daha detaylı ileri çalışmalar yapılması, daha net sonuçlar alınmasına olanak sağlayabilecektir.

SHV türü beta laktamazlara tüm dünyada sıklıkla rastlanmaktadır, fakat SHV enzimleri özellikle *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *Enterobacter* spp. gibi Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. SHV tipi beta laktamaz enzimlerine *P.aeruginosa*'da düşük oranda rastlanmaktadır. Günümüze kadar *P.aeruginosa*'da

SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 olmak üzere üç SHV tipi enzim bildirilmiştir. Bunlardan SHV-2 Fransa'dan, SHV-5 Yunanistan ve Tayland'dan, SHV-12 ise Tayland'dan bildirilmiştir (117,118). Ülkemizde de Enterobacteriaceae ailesinde SHV tipi beta laktamazlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada da SHV tipi beta laktamazlar araştırılmış ancak sonuç negatif olmuştur.

TEM türevi beta laktamaz enzimleri Enterobacteriaceae ailesinin farklı birçok türlerinde, *Pseudomonas*'larda, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*'de yaygındır. *P.aeruginosa*'da özellikle TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 alt türlerine rastlanmaktadır (119). Bu çalışmada TEM tipi beta laktamazlar negatif bulunmuştur.

Japonya'da 1991'den beri **IMP-1** *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes xylosoxidans* ve Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin de içinde bulunduğu gram negatif çomaklar arasında giderek yaygınlaşmıştır. Yine Japonya'da 1996-1997 yılları arasındaki bir çalışmanın sonuçlarına göre *P.aeruginosa* izolatlarının %1.3'ünün ve *S.marcescens* izolatlarının %4.4'ünün plazmid kaynaklı IMP-1 ürettikleri saptanmıştır (80). Kanada'da 1995-1996 yılları arasında Gibb ve ark.'nın (120) yaptığı çalışmada iki ayrı rehabilitasyon servisinden dokuz hastada karbapenemlere, aminoglikozidlere, siprofloksasine ve seftazidime dirençli ancak piperasiline duyarlı *P.aeruginosa* izolatları bulunmuştur. Yapılan çalışmaların sonucunda bu izolatların IMP-1 ile %91 oranında benzerlik gösteren IMP-7 beta laktamazına sahip oldukları saptanmıştır. Son 10 yılda Japonya'da ve Çin'de *P.aeruginosa*'da yaygın olan fakat Avrupa ve Kanada'da da görülen IMP-tipi enzimler artan oranlarda tanımlanmaya başlanmıştır (91). Ülkemizde ilk IMP-1 enzimi bir *K.pneumoniae* suşunda bulunmuştur (121).

VIM tipi enzimler Avrupa ve Güneydoğu Asya'da izole edilen suşlarda yaygındırlar. Avrupa'da ilk MBL olarak VIM-1 İtalya'dan; daha sonra VIM-2 Fransa, Yunanistan, İtalya ve İspanya'dan, ayrıca Kore'den; VIM-2 ve VIM-3 Tayland'dan ve VIM-4 Yunanistan'dan bildirilmiştir (76,80,122). VIM-1 ile VIM-2 arasında %90 aminoasit benzerliği bulunmaktadır (80). VIM tipi MBL'ler çoğunlukla *P.aeruginosa*, *P.putida*, *P.stutzeri*, *Acinetobacter* spp., *Achromobacter xylosoxidans* ve *S.marcescens*'te bulunmaktadır (69). 2002 yılında SENTRY çalışmasına bağlı olarak Walsh ve ark. (76) Polonya'da bir yenidoğanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* suşunun VIM-2 tipi MBL ürettiğini saptamışlardır. VIM-2 enzimi Batı

Avrupa'dan bildirilen ilk MBL olmamakla birlikte bu sonuç MBL varlığının Avrupa kıtasına yayıldığını işaret etmektedir. VIM-2, VIM ailesinin dominant tipidir ve Avrupa'nın birçok ülkesinde izole edilmektedir (123).

Ülkemizde Bahar ve ark. (124) imipeneme dirençli bir *P.aeruginosa* suşundan, Gacar ve ark. (125) ise bir *E.cloacae* izolatından VIM-5 izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise VIM pozitifliğine raslanmamıştır.

IMP-1 ilk olarak 1990'ların başlarında bildirilirken yeni MBL genleri *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. ve Enterobacteriaceae üyeleri gibi birçok önemli patojende bildirilmektedir. IMP-1'in ortaya çıkmasından sonra VIM ailesi, SPM-1, GIM-1 ve SIM-1 olmak üzere dört tip MBL daha bildirilmiştir. **SPM-1** Brezilya, **GIM-1** Almanya ve **SIM-1** Kore ile sınırlı iken IMP tipi MBL'ler Uzakdoğu, Avrupa ve Kanada'da; VIM tipi MBL'ler Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avrupa ve Güney Doğu Asya'da yayılım göstermektedir (84,91,94).

SENTRY çalışması kapsamında 1999-2002 yılları arasında İtalya'nın Genova, Roma ve Katania bölgelerinde izole edilen 383 *P.aeruginosa* suşunun %6.5'inin (imipeneme dirençli bulunanlardan %39.1'inin) MBL ürettiği saptanmıştır (123).

Uzak Doğu'nun dışında dünyanın diğer bölgelerinde *P.aeruginosa* klinik izolalarında MBL üretimi daha ender olmasına rağmen Brezilya ve diğer Latin Amerika ülkelerinde bu direnç mekanizması yaygın olarak görülmektedir. Sao Paulo'da bir *P.aeruginosa* izolatında ilk kez SPM-1'in bildirilmesinden sonra bu enzim Brezilya'da yaygınlaşmıştır. Brezilya'da 2000-2001 yılları arasında toplanan 183 *P.aeruginosa* izolatında %55.6 oranında SPM-1, %30.6 oranında VIM-2 ve %8.3 oranında da IMP-1 bulunmuştur (91,92).

SENTRY çalışmasının Latin Amerika merkezlerinden Arjantin, Brezilya, Şili, Meksika ve Venezuela'da Ocak 2001-Aralık 2003 arasında izole edilmiş 463 *Acinetobacter* spp., 1186 *P.aeruginosa* ve beş *P.fluorescens* örneği incelenmiştir. Yirmibir (%1.77) *P.aeruginosa* SPM-1, yedi (%1.51) *Acinetobacter* spp. ve bir (%20) *P.fluorescens* IMP-1, üç *P.aeruginosa* ve bir *P.fluorescens* VIM-2 varlığı açısından pozitif bulunmuşlardır. İlk IMP-16 varyantı da bu çalışmada bulunmuştur (126).

Ankara'da Fidan ve ark. (111) yaptığı çalışmada 40 *P.aeruginosa* suşunun ikisinde (%5) hem Modifiye Hodge testi ile hem de çift disk sinerji yöntemiyle MBL varlığı tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada PCR yöntemi kullanılmamıştır.

Avrupa ülkelerinde IMP ve VIM türevi MBL'lere rastlandığı için bizim çalışmamızda VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-5, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10, VIM-11a ve VIM-11b'yi içeren VIM ortak primeri ve IMP-1-21'i içeren IMP ortak primeri kullanılmış ancak araştırdığımız 50 *P.aeruginosa* izolatının hiçbirinde PCR yöntemiyle IMP ve VIM tipi MBL'lere raslanmamıştır. Ancak EDTA varlığında imipenem permeabilitesinde artış olmakta ve bu nedenle de yalancı pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. PCR yöntemiyle MBL tipi enzimler negatif olarak saptanmışken; imipenem+EDTA içeren E-test ile 14 (%28); 0,1 M EDTA ve imipenemle yapılan çift disk sinerji testiyle bir (%2), kombine disk testiyle iki (%4); 0,5 M EDTA ve imipenemle yapılan çift disk sinerji testiyle 12 (%24), kombine disk testiyle 26 (%52) suşta MBL pozitifliği saptanmıştır. EDTA yoğunluğu 0,1 M'dan 0,5 M'a çıkarıldığında ÇDST ile pozitiflik %2'den %24'e, kombine disk ile pozitiflik ise %4'ten %52'ye yükselmiştir. PCR ile IMP ve VIM türevi MBL enzimlerine raslanmazken bioassay ile on suşta karbapenemaz enzimi varlığı saptanmıştır. Bu sonuçlar bioassay deneyi ile pozitif bulunan suşlarda ya yeni MBL'lerin varlığını ya da bu çalışmada araştırılmamış olan ve MBL dışında kalan karbapenemazların var olabileceğini düşündürmektedir. Bioassay ile imipenemaz aktivitesi gösteren on suş imipeneme, bu on suştan üçü ise imipenemin yanı sıra meropeneme de dirençli bulunmuştur. 18, 44 ve 47 no.lu suşlar imipeneme dirençli meropeneme duyarlı bulunurken, bu üç suşun bioassay sonuçları da imipenemaz pozitif, meropenemaz negatiftir. Ayrıca 9 ve 13 no.lu suşlarda hem bioassay deneyi negatif hem de imipenem ve meropenem duyarlı bulunmuştur. Tüm bu veriler bioassay deneyinin karbapenemaz enzimlerinin varlığı ile ilgili olarak doğru sonuçlar verdiğini göstermektedir. D sınıfı karbapenemazlar OXA tipi karbapenemazlardan oluşmaktadırlar ve bunlar sıklıkla OXA-1, OXA-2 ve OXA-10 tipi OXA'lardan köken almaktadırlar (127). Bizim çalışmamızda da 4, 5, 10, 12, 15, 18, 44 ve 47 no.lu suşlarda bioassay pozitifliğinin yanı sıra PCR'la da OXA-10 türevi enzimler de pozitif bulunmuştur. Bu sonuç bu suşlarda OXA tipi karbapenemazların olabileceğini düşündürmektedir. 19, 20, 29, 39, 46 ve 50 no.lu suşlar imipeneme duyarlı bulunurken meropeneme dirençli bulunmuşlardır. MexA-MexB-OprM efluks pompa proteinlerinin mutasyonel olarak hiperproduksiyonu meropeneme karşı direnç gelişmesine neden olurken imipenem bu mekanizmadan etkilenmemektedir (128). Bu altı suşta efluks pompasına bağlı olarak meropenem direnci ortaya çıkmış olabileceği varsayılmıştır. Bunun yanı sıra OprD porin kaybı

imipeneme karşı direnç sağlarken meropeneme direnç gelişimine neden olmaz ancak hassasiyetinde azalma sağlayabilir (129). 8, 23, 24, 44, 45 ve 47 no.lu suşlar meropeneme duyarlı kalırken imipenem dirençli bulunmuştur. Bu suşlarda porin kaybına bağlı olarak imipenem direnci gelişmiş olabilir. Ayrıca 39 no.lu suş imipenem duyarlı meropenem dirençli olmasının yanı sıra IEF ile 8.2 pI değerinde bir bant göstermiştir ve çift disk indüksiyon yöntemiyle de indüklenebilir beta laktamaz (İBL) varlığı saptanmıştır. Yüksek pI değeri ve İBL pozitifliği bu suşta AmpC tipi beta laktamaz pozitifliği olabileceğini düşündürmektedir. AmpC tipi beta laktamaz enzimlerinin karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişikliği gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (31).

GSBL tespiti için çift disk sinerji yöntemi yalnız *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *E.coli* ve *P.mirabilis* için standardize edilmiş olduğundan *Pseudomonas*'lar ve diğer gram negatif bakteriler için çift disk sinerji testi sonucu ancak "tahmini GSBL" olarak yorumlanabilmektedir. Bu bakterilerde kesin GSBL sonucu, ileri moleküler inceleme gerektirmekte; bu ise rutin laboratuvarlarda yaygın olarak uygulanmadığı için, örneğin *Pseudomonas*'larda, GSBL verileri sınırlı kalmaktadır. Antalya'da İnan ve ark. (130) 2002 yılında yaptıkları çalışmada 105 *P.aeruginosa* suşunun 13'ünde (%12) çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliği saptamışlardır.

Bu çalışmaya alınan 50 çoğul dirençli *P.aeruginosa* izolatında çift disk sinerji testiyle (ÇDST) dokuz izolatta (%18) GSBL pozitifliği bulunurken, PCR yöntemiyle 22 (%44) PER-1, 43 (%86) GES/IBC, 23 (%46) OXA-10 ve 14 (%28) OXA-2 olmak üzere 48 suşta (%96) GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu sonuçlar *P.aeruginosa*'da GSBL araştırılmasında klasik ÇDST'nin yetersiz olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte ÇDST ile pozitif olan dokuz suşun tümünde PCR yöntemi ile de GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu sonuçlar *P.aeruginosa*'da ÇDST'nin yalancı pozitif sonuç vermediğini ancak, yalancı negatif sonuç verebileceğini göstermektedir. Bu durum *P.aeruginosa*'da GSBL varlığı açısından ÇDST ile saptanan pozitifliğin kabul edilebilir, negatifliğin ise kabul edilemez sonuç olduğunu düşündürmektedir. Fenotipik olarak GES tipi enzimlerin saptanması için kloksasilinli besiyerinde yapılan ÇDST ile ise dört suşta GES tipi enzim pozitifliği saptanmış, dört suşun tümü PCR yöntemiyle GES/IBC pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte GES/IBC pozitifliği PCR ile çok daha yüksek bulunduğu

için bu fenotipik test sonucunu da pozitif bulunduğunda kabul edilebilir, negatif bulunduğunda ise kabul edilemez olarak düşünmek gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada araştırılmış olan GSBL tipi beta laktamaz enzimlerinden ülkemizde *P.aeruginosa* izolatlarında yaygın olarak saptanan PER-1, OXA-2 türevi ve OXA-10 türevi enzimler pozitif bulunmuştur. Bunun yanı sıra ülkemizde daha önce araştırılmamış olan GES/IBC türevi beta laktamaz enzimleri de yüksek oranda pozitif bulunmuştur. Bu sonuç bizim toplumumuzda da GES/IBC türevi beta laktamaz enzimlerinin yaygın olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Barış Yayınevi; 1995. pp.161-172.
2. Baron EJ, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 1990.pp.148-386.
3. Çıragil P, Söyletir G, Şener B, Erturan Z. Kistik fibroz ve diğer alt solunum yolu infeksiyonlarında izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002; 33: 197-202.
4. Erdem B. *Pseudomonaslar*. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. pp.551-571.
5. Vahaboğlu H, Akhan SÇ. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. pp.1608-1024.
6. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*. Stamford: Twenty-First Edition; 1998.pp.231-236.
7. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, Devault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Mısra TK, Chakrabarty AM. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 191-206.
8. Otkun M. Diğer Enterik bakteriler ve *Pseudomonas* türleri. İçinde Serter D, Ertem E, Gökengin D. Editörler. *Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları*. İzmir: Nobel Tıp Kitabevi;1998. pp.253-263.
9. Delden CU, Iglewski BH. Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 551-560.

10. Bergman U, Scheffer J, Koller M, Schonfeld W, Erbs G, Müller FE, König W. Induction of inflammatory mediators (histamin and leukotrienes) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by *Pseudomonas aeruginosa* strains from burn patients. *Infect Immun* 1989; 57: 2187-2195.
11. Que VJ, Woods DE. Alteration of lung structure and function by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol Immunopathol Res* 1987; 6: 93-102.
12. Colin D, Louis D, Bernillon J, Guinand M, Wallache J, Las A. Alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS Immun Med Microbiol* 1997; 18: 175-184.
13. Wick MJ, Frank DW, Storey DG, Iflewski BH. Identification of *Reg B*, a gene required for optimal exotoxin a yields in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 489-497.
14. Woods DE, Sokol PA, Bryan LE, Storey DG, Mattingly SJ, Vogel HJ, Ceri H. In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis* 1991; 163: 143-149.
15. Sokol PA, Iglewski BH, Hager TA, Sadoff JC, Cross AS, Mc Manus A, Ferber BF, Iflewski WJ. Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1981; 34: 147-153.
16. Woods DE, Sokol PA. Use of transposon mutants to asses the role of exoenzymes S in chronic pulmonary disease due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4: 163-169.
17. Yagcı A, Tunc Y, Soyletir G. Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comporasion of two procedures. *New Microbiol* 2002; 25: 223-229.
18. Morihara K, Tsuzuki H. Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. *Infect Immun* 1997; 3: 679-685.

19. Wretling B, Paulovskis OR. Pseudomonas aeruginosa elastase and its role in Pseudomonas infection. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 998-1004.
20. Denton M, Wilcox MH. Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 468-474.
21. Doig P, Paranchych W, Sastry PA, Irvin RT. Human buccal epithelial cell receptors of Pseudomonas aeruginosa: identification of glycoproteins with pilus binding activity. *Can J Microbiol* 1989; 35: 1141-1145.
22. Pitt TL. Lipopolysaccharide and virulence of Pseudomonas aeruginosa. *Antibiot Chemother* 1989; 42: 1-7.
23. Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67: 3-8.
24. Mc Avoy MJ, Newton V, Paull A, Morgan J, Gacesa P, Russel NJ. Isolation of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa from non-cystic-fibrosis patients and characterisation of the structure of their secreted alginate. *J Med Microbiol* 1989; 28: 183-189.
25. Schultz DR, Müller KD. Elastase of Pseudomonas aeruginosa: inactivation of complement-derived and phagocytic factors. *Infect Immun* 1974; 10: 128-135.
26. Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Bakarar J, Hentzer M, Molin S, Kharazmi A, Hoiby N, Mathee K. Alginate production affects Pseudomonas aeruginosa biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* 2004; 53: 679-690.
27. Bagge N, Shuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, Hoiby N. Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1175-1187.
28. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001; 183: 1047-1057.

29. Wozniak DJ, Wyckoff TJA, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsel MR. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of National Academy of Science* 2003; 100: 7907-7912.
30. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığının E-test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2004; 34: 33-36.
31. Gülay Z, Taşkiran Aİ, Kaplan O, Saylak MÖ. Beta-laktamazlar. *DEU Tıp Fak Derg* 2001; 12: 343-358.
32. Yoon SS, Cookley R, Lau GW, Lyman SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang SH, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hasset DJ. Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* acidified nitride derivatives under cystic fibrosis airway conduction. *J Clin Invest* 2006; 116: 436-446.
33. Bal Ç. Toplum kökenli infeksiyonlarda gram negatif çomak direnci. *Ankem Derg* 2006; 20: 278-281.
34. Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. *Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumda Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi* 2002; 31: 83-100.
35. Gür D. B-laktamazların sınıflandırılması. *Flora* 1996; 2: 80-86.
36. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
37. Moellering RC. Meeting the challenges of beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 1-8.
38. Bal Ç. Beta-laktamazlar: güncel durum. *Flora* 2003; 8: 111-23.
39. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2488-2493.

40. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
41. Matthew M, Harris A, Marshall M, Boss G. The use of analytical isoelectrik focusing for detection and identification of beta-lactamases *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-178.
42. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085-1089.
43. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 259-271.
44. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 439-445.
45. Sanders CC, Sanders WE. Clinical importance of inducible beta-lactamases in gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 435-438.
46. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2046-2048.
47. Bennett PM, Chopora I. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 153-158.
48. Livermore DM. β -lactamase-mediated resistance and opportunités for its control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 25-41.
49. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-2209.
50. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-331.

51. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 826-836.
52. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392.
53. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2990-2995.
54. Heritage J, M'Zali FH, Binzi DG, Hawkey MP. Evolution and spread of SHV extended β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 309-318.
55. Robin F, Delmas J, Archambaud M, Schweitzer C, Chanal C, Bonnet R. CMT-type β -lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum β -lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 47: 2403-2408.
56. Yu WL, Chuang YC, Rasmussen JW. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 264-277.
57. Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal Ç, Bauerfeind A. Hastanede yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *Escherichia coli* suşunda CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazın tanımlanması. *Mikrobiyol Bült* 2005; 39: 421-429.
58. Lartigue MF, Poirel L, Heriter C, Tolün V, Nordmann P. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 315-316.
59. Moland ES, Black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarty S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2382-2383.

60. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE: OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-1644.
61. Danel F, Frere JM, Livermore DM. Evidence of dimersation among class D-beta-lactamases: kinetics of OXA-14 beta-lactamase. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546: 132-142.
62. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3117-3122.
63. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785-790.
64. Danel F, Hall LMC, Duke B, Gür D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1362-1366.
65. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leutard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1615-1620.
66. Vahaboglu H, Sarıbas S, Akbal H, Ozturk R, Yucel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 269-270.
67. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 44: 104-114.
68. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -

- lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1749-1751.
69. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Briand YM, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-969.
70. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balık İ, Aydın K, Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-2269.
71. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 178-182.
72. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Cauto E, Gutkind G. extended-spectrum beta lactamases in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2864-2867.
73. Aubert D, Naas T, Nordmann P. IS1999 increase expression of the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2003; 185: 5314-5319.
74. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, Lia H, Yang L, Lu Y. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 826-831.
75. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Ito H, Arakawa Y. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a

- neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1960-1967.
76. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europa: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116-119.
77. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 49: 3593-3597.
78. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392.
79. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3008-3011.
80. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
81. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-5413.
82. Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K. İmipenem dirençli *Pseudomonas* suşlarında saptanan direnç mekanizmaları. *Ankem Derg* 1998; 12: 56-62.
83. Murpy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase

- SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 582-587.
84. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla* (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485-4491.
85. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014-2016.
86. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. IMP-12, a New plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522-1528.
87. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach AC, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-679.
88. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac*(6')-30/*aac*(6')-1b': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4693-4702.
89. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-1434.
90. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. VIM-12, a novel plasmid-mediated

- metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/ VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5153-5156.
91. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1406-1409.
92. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamase produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 63-82.
93. Murpy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 582-587.
94. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-4661.
95. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S16, Pennsylvania, 2006.
96. Petropoulou D, Tzanetou K, Syriopoulou VP, Daikos GL, Ganteris G, Malamau LE. Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo-beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. *Microb Drug Res* 2006; 12: 39-43.
97. <http://www.lahey.org/studies>
98. Güner SK (2003) *Pseudomonas aeruginosa'da porin direncinin saptanması*. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul .

99. Aktas Z, Poirel L, Salcioglu M, Bal C, Ang O, Nordmann P. PER-1 and OXA-10 like beta lactamases in ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 193-198.
100. Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV in nosocomial infection associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 659-664.
101. Migliavacco R, Docquie JP, Mugnailo C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rassolini GN, Pagoni L. Simple micro dilution test for detection of metallo beta lactamase production *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4388-4390.
102. Pereira M, Perilli M, Mantengoli E, Luzzaro F, Toniola A, Rassolini GN, Amicosante G. PER-1 extended-spectrum beta lactamase production in an *Alcaligenes faecalis* clinical isolates resistant to extended-spectrum sephalosporins and monobactams from a hospital in Northern Italy. *Microb Drug Res* 2000; 6: 85-90.
103. Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GAE-1, a novel class an extended-spectrum beta lactamase and the class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622-632.
104. Speldooren V, Heym B, Labia R, Chonoine MHN. Discriminatory detection of inhibitor resistant beta lactamases in *Escherichia coli* by single-standart conformation polymorphisim PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 879-884.
105. Walsh TR, Toleman MA, Hurniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europa: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116-119.
106. Weldhagen GF. Sequence-selective recognition of extended-spectrum beta lactamase GES-2 by a competitive, peptide nucleic acid-

- based multiplex PCR assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3402-3406.
107. Wang CX, Mi ZH. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-1 metallo- β -lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD. *J Med Microbiol* 2006; 55: 353-354.
108. Fiett J, Baraniak A, Mrówka A, Malgorzata F, Kawa ZD, Naumiuk L, Samet A, Hryniewicz W, Gniadkowski. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 880-886.
109. Tanır G, Göl N. Antibiyotik direnci. *Klinik Derg* 1999; 12: 47-54.
110. <http://www.aic.cuhk.edu.hk>
111. Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metalo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg* 2005; 19: 68-70.
112. Harris A, Viera CT, Venkatamaran L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1128-1133.
113. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Agents* 2004; 24: 585-591.
114. Mimos O, Elhelali N, Leotard S, Jacolot A, Laurent F, Samii K, Petitjean O, Nordmann P. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 91-97.
115. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs T, Dove MG, Nordmann P. GES-2 a class A β -lactamase from *Pseudomonas*

- aeruginosa with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2598-2603.
116. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2247-2253.
117. Poirel L, Lebessi E, Castro M, Feure C, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2277-2279.
118. Neonakis IK, Scoulica EV, Dimitriou SK, Gikas AI, Tselentis YJ. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb Drug Res* 2003; 9: 961-965.
119. Dubois V, Arpin C, Noury P, Andre C, Loure C, Quentin C. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21 producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteria* in a nursing home. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4129-4138.
120. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MFI, Woodford N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-258.
121. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 695-696.
122. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116-119.

123. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DMC, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 61-70.
124. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 282-283.
125. Gacar GG, Midilli K, Kolaylı F, Ergen K, Gundeş S, Hoşoğlu S, Karadenizli A, Vahaboğlu H. Genetic and enzymatic properties of metallo- β -lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4400-4403.
126. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Inter J Antimicrob Agents* 2005; 25: 57-61.
127. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemase: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489-495.
128. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-640.
129. Pai H, Kim JW, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms clinical isolates in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 480-484.
130. İnan D, Saba R, Seyman D, Mamikoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2004; 18: 293-296.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NİGAR	Soyadı	ÇELİK
Doğ.Yeri	AUGSBURG	Doğ.Tar.	30.05.1975
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	15197390926
Email	ncelik@istanbul.edu.tr	Tel	0212 8721972

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İSTANBUL TIP FAK. MİKRO VE KLİNİK MİKRO AD	2001
Lisans	İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAK. TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER	1998
Lise	ÖZEL ORTADOĞU LİSESİ	1993

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BİYOLOG	CERRAHPAŞA TIP FAK. ÇOCUK SAĞLIĞI VE HAST. AD MİKROBİYOLOJİ LAB.	1998-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZE	İYİ	ORTA	ORTA	51.250	
ALMANCA	İYİ	İYİ	İYİ		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	60.012	61.956	63.900
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	İYİ
Microsoft Office Excel	İYİ