

T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SUŞLARINDA SEFTAZİDİM
AVİBAKTAM'A KARŞI İN VİTRO DUYARLILIK
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE BAZI
KARBAPENEMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. İsmail Aytaç ACAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Hande AFŞARLAR

ÇORUM 2023

T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEME DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SUŞLARINDA SEFTAZİDİM
AVİBAKTAM'A KARŞI İN VİTRO DUYARLILIK
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE BAZI
KARBAPENEMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. İsmail Aytaç ACAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Hande AFŞARLAR

ÇORUM 2023

Bu tez Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
TIP19004.22.002 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecinde desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. üyesi Hande AFŞARLAR'a, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı başkanı Doç. Dr. Ünsal SAVCI'ya ve Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji ekibine en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez süreci boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Djursun KARASARTOVA'ya,

Birlikte çalışmaktan dolayı mutluluk duyduğum ve güzel anılar biriktirdiğim asistan arkadaşım Merve AKTI'ya,

Tecrübelerinden yararlandığım değerli bilim insanları Prof. Dr. Banu SANCAK ve Prof. Dr. Barış OTLU'ya,

Her koşulda sonsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan, babam Ayhan ACAR'a, annem Zülfünaz ACAR'a, kardeşlerim Ayberk ACAR ve Arda ACAR'a,

Son olarak bana sevgiyi, iyiliği ve umut etmeyi hatırlatan, nahif karakteriyle şanslı ve değerli hissetmemi sağlayan hayat arkadaşım Büşra'ya,

İçtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TIP19004.22.002 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Dr. İsmail Aytaç ACAR

Çorum-2023

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	VI
V. KISALTMALAR	VIII
VI. TABLO LİSTESİ.....	XII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Tarihçesi ve Sınıflandırılması	3
2.1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Morfolojisi ve Kültür Özellikleri	4
2.1.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Biyokimyasal Özellikleri	5
2.1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Patogenezi.....	6
2.1.5. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri	6
2.1.6. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Epidemiyolojisi	11
2.1.7. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonları	11
2.1.8. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Genomu ve Yüksek Riskli Klonlar	13
2.1.9. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Laboratuvar Tanısı	14
2.1.10. <i>P.aeruginosa</i> 'nın Tedavisi	14
2.1.11. <i>P.aeruginosa</i> 'da Antimikrobiyal Direnç	14
2.2. Karbapenem Direnci.....	17
2.2.1. Karbapenemazlar	17
2.2.2. Dış Membran Porin Defekti	22
2.2.3. Dışa Atım Pompa Sistemi.	23
2.3. Karbapenem Dirençli <i>P.aeruginosa</i> 'da Kullanılan Ajanlar	24
2.3.1. Seftazidim Avibaktam.....	24
2.3.2. Seftolozan Tazobaktam.	24
2.3.3. İmipenem/silastatin Relebaktam.....	25
2.3.4. Sefiderokol	25
2.3.5. Kolistin	26
2.4. Karbapenemaz Üretiminin Tayininde Kullanılan Fenotipik Yöntemler	26
2.4.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM)	26

2.4.2. Modifiye Hodge Testi (MHT)	27
2.4.3. Kolorimetrik Testler.....	27
2.4.4. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	27
2.4.5. İnhibitör Temelli Tetler (Gradyent test, Kombinasyon Disk Testi, Çift Disk Sinerji Testi).....	28
2.4.6. İmmünokromatografik Yöntemler (Lateral Flow).....	28
2.5. Karbapenemaz Tayininde Kullanılan Genotipik Yöntemler	29
2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	30
2.6.1. Disk Difüzyon (Kirby Bauer) Yöntemi.....	30
2.6.2. Gradyent Test Yöntemi (E-test).....	30
2.6.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	31
2.6.4. Otomatize Sistemler	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Çalışmanın İzni	32
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	32
3.3. Çalışmada Kullanılan İzolatların Tanımlanması Ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi	33
3.4. Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması	34
3.5. Vitek 2 Compact Otomatize Sistemi	34
3.6. Karbapenemaz Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması.....	34
3.7. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	35
3.7.1. Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	35
3.7.2. Dilüsyon Basamakları	36
3.7.3. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanışı	38
3.7.4. Mikroplak Uygulaması ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	38
3.8. Moleküler Yöntemle Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması	40
3.8.1. DNA İzolasyonu	41
3.8.2. PCR Yöntemi ile DNA Amplifikasyonu.....	42
3.8.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Saptanması	44
3.9. İstatistik	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	66
8. EKLER	80

III. ÖZET

Amaç: Seftazidim avibaktam duyarlılığını güvenilir bir şekilde belirlemek için alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidim avibaktam duyarlılığını değerlendirmek için referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle sık görülen karbapenemaz genlerinin (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48, GES) araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mart 2021-Ocak 2023 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli 103 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Seftazidim avibaktam duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Karbapenemaz üretiminin fenotipik tayini, karbapenem inaktivasyon yöntemiyle yapılmıştır. Genotipik tayin için DNA izolasyonu yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi uygulanmış, çoğaltılan gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi sayesinde yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

Bulgular: İzolatların %69'u sıvı mikrodilüsyon sonuçlarına göre seftazidim avibaktama duyarlı, %31'i seftazidim avibaktama dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi uygulanan 98 izolat, sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla uyumlu sonuç vermiş olup iki izolat teknik belirsizlik alanı içerisinde bulunmuş, üç izolatta uyumsuz sonuç gözlenmiştir. Teknik belirsizlik alanı içinde bulunan izolatlar sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmuştur. İki izolat disk difüzyon ile seftazidim avibaktama dirençli bulunup sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunurken, bir izolat disk difüzyon ile seftazidim avibaktama duyarlı bulunup sıvı mikrodilüsyon ile dirençli saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile 2 NDM, 1 VIM ve 8 GES üreten izolat tespit edilmiştir. NDM ve VIM üreten üç izolatta karbapenem inaktivasyon metodu pozitifliği saptanmış, karbapenem inaktivasyon metodu sonucu pozitif olan iki izolatta ise karbapenemaz geni saptanamamıştır.

Sonuç: Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında disk difüzyon yöntemiyle duyarlı saptanan izolatların sonuçlarının referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. Disk difüzyon sonucunun dirençli veya teknik belirsizlik alanı sınırları içinde bulunduğu izolatlarda ise referans yöntemle duyarlılık sonucunun doğrulanması gerektiği düşünülmektedir. Karbapenemaz üretimini saptamak için karbapenem inaktivasyon metodu kullanılmakla birlikte kesin tayin için polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin daha başarılı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *P. aeruginosa*, Seftazidim avibaktam, Sıvı mikrodilüsyon, Karbapenem direnci, Polimeraz zincir reaksiyonu



IV. ABSTRACT

Comparison of In Vitro Susceptibility Methods Against Ceftazidime Avibactam in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains and Investigation of some Carbapenemase Genes

Objective: Alternative methods are needed to ceftazidime avibactam sensitivity detect reliably. In this study, it was aimed to compare the reference method broth microdilution and disk diffusion methods to evaluate ceftazidime avibactam susceptibility in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and to investigate the common carbapenemas genes (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48, GES) using the polymerase chain reaction method.

Materials and Methods: Between March 2021 and January 2023, 103 carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates isolated from clinical samples sent to Hitit University Çorum Erol Olçok Education and Research Hospital Medical Microbiology laboratory were included in the study. Disc diffusion and broth microdilution methods were used to determine ceftazidime avibactam susceptibility. Carbapenem inactivation method was used for the phenotypic determination of carbapenemase production. After DNA isolation for genotyping determination, polymerase chain reaction method was applied, the amplified gene regions were move by agarose gel electrophoresis and viewed under UV light.

Results: According to the broth microdilution results of the isolates, 69% were found to be susceptible to ceftazidime avibactam, and 31% were found to be resistant to ceftazidime avibactam. 98 isolates to which the disk diffusion method was applied gave results compatible with broth microdilution results, two isolates were found within the area of technical uncertainty, and three isolates were observed discordant results.

Isolates within the area of technical uncertainty were found susceptible to broth microdilution. While isolates resistant to ceftazidime avibactam by disc diffusion in two isolates were found to be susceptible to broth microdilution, isolates susceptible to disc diffusion and ceftazidime avibactam in one isolate were found to be resistant to broth microdilution. With polymerase chain reaction method was detected isolate producing 2 NDM, 1 VIM and 8 GES. Carbapenem inactivation method positivity was detected in three isolates producing NDM and VIM, but carbapenemase gene was not detected in two carbapenem inactivation method positive isolates.

Conclusion: It was determined that the results of the isolates that were found susceptible by the disc diffusion method in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates were compatible with the reference method, broth microdilution. It is thought that the susceptibility result should be confirmed with the reference method in isolates where the disk diffusion result is resistant or within the limits of the technical uncertainty area. Although the carbapenem inactivation method was used to detect carbapenemase production, the polymerase chain reaction method was found to be more successful for the definitive determination.

Keywords: *P. aeruginosa*, Ceftazidime avibactam, Broth microdilution, Carbapenem resistance, Polymerase chain reaction

V. KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AB	: Avrupa Birliği
ABC	: Adenozin Trifosfat Bağlayan Kaset
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADPRT	: Adenozin difosfat ribozil transferaz
ADT	: Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
AIM	: Adelaide Imipenemase
ATCC	: American Type Culture Collection
ATU	: Teknik Belirsizlik Alanı
BHI	: Brain Heart Infusion
BK	: Besiyeri kontrolü
BL/BLİ	: β-laktam β-laktamaz İnhibitörü
Bp	: Baz çifti
C	: Konsantrasyon
CA	: Klavulanik Asit
Cfu	: Koloni Oluşturan Birim
CIM	: Karbapenem İnaktivasyon Metodu
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	: Santimetre
CRAB	: Karbapenem Dirençli <i>Acinetobacter baumannii</i>
CRE	: Karbapenem Dirençli <i>Enterobacterales</i>
CRPA	: Karbapenem Dirençli <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CT	: Seftolozan Tazobaktam
CTZ	: Seftazidim
CZA	: Seftazidim Avibaktam
ÇİD	: Çoklu İlaç Dirençli

DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPA	: Dipikolinik Asit
DTA	: Derin Trakeal Aspirat
DTR	: Tedavisi Zor Dirençli
eDNA	: Ekstraselüler DNA
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EF-2	: Elongasyon faktör-2
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
EMB	: Eosin Methylen Blue
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExoA	: Ekzotoksin A
ExoS	: Ekzotoksin S
ExoT	: Ekzotoksin T
ExoU	: Ekzotoksin U
ExoY	: Ekzotoksin Y
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi
GAP	: Guanozin Trifosfaz Aktive Edici Protein
GES	: Guiana Extended Spectrum
GIM	: German Imipenemase
Gr	: Gram
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz
IFN- γ	: İnterferon gama
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IMI	: İmipenem hidrolize edici beta laktamaz
IMP	: Imipenemase
KAMHB	: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
KDE	: Kan Dolaşımı Enfeksiyonu
KF	: Kistik Fibrozis
KİAE	: Komplike İntraabdominal Enfeksiyonu
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

KPC	: Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase
KÜSE	: Komplike Üriner Sistem Enfeksiyonu
L	: Litre
LasA	: Serin Proteaz
LasB	: Çinko Metalloproteaz
LES	: Liverpool Epidemik Suşu
LPS	: Lipopolisakkarit
MALDI-TOF MS	: Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
MATE	: Çoklu İlaç Ve Toksik Bileşik Parçalama
MBL	: Metallobetalaktamaz
mCIM	: Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu
MFS	: Ana Kolaylaştırıcı Üst Aile
Mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHT	: Modifiye Hodge Testi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mL	: Mililitre
MLST	: Çoklu Lokus Sekans Tipleme
Mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NDM	: New Delhi Metallobetalactamase
nM	: Nanomolar
NMC	: Non Metallo Carbapenemase
OXA	: Oxacillinase
PBA	: Fenilboronik Asit
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Pulse Field Jel Elektroforezi
QS	: Quorum Sensing
R	: Dirençli
RL	: Ramnolipid

RND	: Direnç Nodülasyon Bölümü
S	: Duyarlı
SB	: Sulbaktam
SIM	: Seul Imipenemase
SMD	: Sıvı Mikrodilüsyon
SME	: Serratia Marcescens Enzyme
SMR	: Küçük Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein Ailesi
SPM	: Sao Paulo Metallobetalactamase
T2SS	: Tip 2 Sekresyon Sistemi
T3SS	: Tip 3 Sekresyon Sistemi
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TLR	: Toll Like Reseptör
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
TZB	: Tazobaktam
TZP	: Piperasilin tazobaktam
U	: Ünite
ÜK	: Üreme kontrolü
ÜSE	: Üriner Sistem Enfeksiyonu
V	: Volt
VIM	: Verona Integron-Encoded Metallobetalactamase
VİP	: Ventilatörle İlişkili Pnömoni
WGS	: Tüm Genom Dizileme
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XDR	: Yaygın dirençli

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tıbbi önemi olan polar flajellalı nonfermentatif basiller (13).....	4
Tablo 2. Tıbbi önemi olan <i>Pseudomonas</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri (13, 17)....	5
Tablo 3. <i>P. aeruginosa</i> 'daki virülans faktörleri ve sekresyon sistemleri (3, 18, 21).....	10
Tablo 4. Beta laktamazların sınıflandırılması (44-46).....	18
Tablo 5. <i>P. aeruginosa</i> tedavisinde kullanılan yeni BL/BLİ antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmaları (85).....	25
Tablo 6. Karbapenemazlara inhibitör temelli yaklaşım (94)	28
Tablo 7. CTZ stok çözeltisinin mikropalak kuyucuklarına dağıtılması	37
Tablo 8. CZA duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmesinde kullanılan mikropalak düzeni.....	39
Tablo 9. EUCAST'ın <i>P. aeruginosa</i> için belirlediği meropenem ve seftazidim avibaktam antibiyotiklerinin disk difüzyon zon çapları ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri (117).....	40
Tablo 10. Karbapenemaz üretiminden sorumlu <i>blaKPC</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaOXA-48</i> ve <i>blaGES</i> gen bölgeleri için kullanılan primer dizileri	42
Tablo 11. Karbapenemaz üretiminden sorumlu <i>blaKPC</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaOXA-48</i> ve <i>blaGES</i> gen bölgelerinin amplifikasyon koşulları	43
Tablo 12. PCR karışımlarının içeriği.....	43
Tablo 13. CRPA izolatlarının CZA disk difüzyon, CZA MİK, CIM ve PCR sonuçları	48
Tablo 14. Dünyada <i>P. aeruginosa</i> izolatlarındaki karbapenemazları bildiren bazı çalışmalar	61

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm gelişimi (26)	9
Şekil 2. 2021 yılında karbapenemaz üreten <i>P. aeruginosa</i> 'nın dünyadaki dağılımı (4) .	22
Şekil 3. <i>P. aeruginosa</i> 'da dışa atım pompasının şeması (78).....	23
Şekil 4. Karbapenem inaktivasyon metodunun uygulanması (26)	35
Şekil 5. Sıvı mikrodilüsyon hazırlıkları	38
Şekil 6. CRPA izolatlarının kliniklere göre dağılım yüzdeleri.....	45
Şekil 7. CRPA izolatlarının örnek türlerine göre dağılım yüzdeleri.....	45
Şekil 8. CRPA izolatlarında CZA duyarlılığının disk difüzyonla belirlenmesi	46
Şekil 9. CIM sonucu pozitif, negatif ve belirsiz olan izolatlar ile pozitif ve negatif kontrol örnekleri.....	47
Şekil 10. CRPA suşlarında SMD ile MİK belirlenmesi.....	47
Şekil 11. <i>blaKPC</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaOXA-48</i> ve <i>blaVIM</i> pozitif kontrolleri ile NDM ve VIM üreten izolatların PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	51
Şekil 12. <i>blaIMP</i> pozitif kontrollerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	52
Şekil 13. <i>blaGES</i> pozitif kontrolü ile GES üreten izolatların PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteriyel patojenlerde antimikrobiyal direnç, yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanan küresel bir sorundur. Gram negatif bakteriler, dünya çapında giderek yaygınlaşan çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşların neden olduğu ciddi komplikasyonlara ve tedavi başarısızlığına neden olabilir. ÇİD enfeksiyonların tedavisinde geniş spektrumlu bir antibiyotik sınıfı olan karbapenemler giderek daha fazla ön plana çıkmaktadır (1). Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten bakterilerin yaygınlaşmasından dolayı karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanımında artış olmuştur. Bu nedenle, karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA), *Acinetobacter baumannii* (CRAB), ve *Enterobacterales* (CRE) suşlarının ortaya çıkması ve yayılması daha fazla dikkat çekmiştir (2).

P. aeruginosa, yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Sağlık hizmeti ile ilişkili pnömoni, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) veya kistik fibrozis (KF) olan bireylerde yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Bu nedenle *P. aeruginosa*, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yeni antibiyotik geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulan bakteriyel patojenler listesinde "kritik" kategoriye dahil edilmiştir (3). *P. aeruginosa* enfeksiyonunda antipsödomonal β -laktam antibiyotikler, β -laktam β -laktamaz inhibitörü (BL/BLİ) kombinasyonları ve karbapenemler tedavide kullanılır. Karbapenemler, ÇİD *P. aeruginosa*'ya karşı sıklıkla tercih edilen seçeneklerdendir (4). *P. aeruginosa*'da plazmid aracılığı ile üretilen karbapenemaz enzimlerinin varlığı, porin kodlayan genlerdeki mutasyonlar ve dışa atım pompalarını kodlayan genlerdeki aşırı ekspresyon nedeniyle karbapenem direnci görülebilir (5).

Üçüncü kuşak bir sefalosporin olan seftazidim (CTZ), *P. aeruginosa* da dahil olmak üzere gram negatif basillere karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Avibaktam, GSBL ve KPC karbapenemazların da dahil olduğu Ambler sınıf A β -laktamazlara, Ambler sınıf C β -laktamazlara (AmpC sefalosporinazlar) ve bazı Ambler

sınıf D β -laktamazlara (OXA-48) karşı güçlü in vitro aktiviteye sahip olan bir β -laktamaz inhibitörüdür, ancak aktif bölgesinde çinko atomu bulunan sınıf B metallobetalaktamazlara (NDM, VIM, IMP vb.) karşı etkisizdir (6). Seftazidim avibaktam (CZA), üçüncü kuşak sefalosporin olan CTZ ile β -laktam olmayan β -laktamaz inhibitörü avibaktamın intravenöz olarak uygulanan bir kombinasyonudur. Avrupa Birliği (AB) tarafından yetişkinlerde komplike intraabdominal enfeksiyonlar (KİAE), komplike üriner sistem enfeksiyonları (KÜSE) ve ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) tedavisi için onaylanmıştır (7).

CRPA enfeksiyonlarına yönelik tedaviyi kolaylaştırmak için CZA in vitro duyarlılık testi sonuçları kritiktir. Antibiyotik duyarlılığını belirlerken referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile otomatize sistemlerin uygulanması pahalı veya zahmetlidir. Bu nedenle, CZA duyarlılığını güvenilir bir şekilde belirlemek için alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır (8).

Çalışmamızın amacı mikrobiyoloji laboratuvarındaki CRPA suşlarında CZA duyarlılığını değerlendirmek için referans yöntem olan SMD ile disk difüzyon yöntemlerini in vitro olarak karşılaştırmak ve CRPA suşlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle sık görülen direnç genlerini (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48, GES) araştırmaktır. Bu çalışma CRPA suşlarının CZA duyarlılığının değerlendirilmesinde otomatize sistem ve SMD kullanımının yaygınlaşmadığı laboratuvarlar için basit bir yöntem olan disk difüzyon yönteminin kullanılabilmesi ve olası karbapenemaz direnç genlerinin varlığı açısından katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa; toprakta, suda, bitkilerde ve insanlarda yaşama yeteneğine sahip olan gram negatif bir bakteridir. Besin açısından yetersiz koşullarda ve geniş bir sıcaklık aralığında (4°C-42°C) yaşayabilen bir mikroorganizmadır. *P. aeruginosa*, inatçı adaptasyonu sayesinde hastanelerdeki kuru ve cansız yüzeylerde 6 aya kadar canlı kalabilir. Fırsatçı nozokomiyal enfeksiyonların nedenlerinden biri olan *P. aeruginosa*, özellikle ciddi yanık/ameliyat yarası bulunan, malignitesi olan veya bağışıklığı baskılanmış hastaları enfekte eder (9).

2.1.1. *P. aeruginosa*'nın Tarihçesi ve Sınıflandırılması

P. aeruginosa ilk kez 1862'de Luke tarafından mavi-yeşil renkteki püyük mikroskopik incelemesinde çomak parçacıklar olarak gözlemlenmiştir (10). 1882'de Carle Gessard, bandajları mavi ve yeşil renkte olan askerlerin yara enfeksiyonlarından *P. aeruginosa*'yı ilk kez izole etmiştir (11).

1894'te Walter Migula, *Pseudomonas* cinsini ilk olarak polar flajellalı, gram negatif, çomak şeklindeki aerobik basilleri kapsayacak şekilde tanımlamıştır. Cinsin taksonomisinde uzun yıllar fizyolojik ve biyokimyasal özellikler kullanılmış olup 1984'te Palleroni, rRNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla psödomonadları beş alt gruba ayırmıştır (12).

P. aeruginosa, *Proteobacteria* şubesinin gama alt sınıfında olup *Pseudomonadaceae* ailesinin *Pseudomonas* cinsine ait olan nonfermentatif gram negatif bir basildir (11). Tıbbi önemi olan polar flajellalı nonfermentatif basillerin gruplandırılması Tablo 1'de açıklanmıştır.

Tablo 1. Tıbbi önemi olan polar flajellalı nonfermentatif basiller (13)

rRNA homoloji grubu ve alt gruplar		Cins ve Tür
rRNA Grup I Aile: <i>Pseudomonadaceae</i> Cins: <i>Pseudomonas</i>	Floresan Grubu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
	Stutzeri Grubu	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendonica</i>
	Alcaligenes Grubu	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
rRNA Grup II Aile: <i>Burkholderiaceae</i>	Pseudomallei Grubu	<i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks <i>Cupravidius</i> türleri <i>Pandoraea</i> türleri <i>Ralstonia</i> türleri
rRNA Grup III Aile: <i>Comamonadaceae</i>	Zayıf Oksidan Grup	<i>Comamonas</i> türleri <i>Acidovorax</i> türleri <i>Delftia</i> türleri
rRNA Grup IV Aile: <i>Caulobacteraceae</i>	Diminuta Grubu	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>
rRNA Grup V Aile: <i>Xanthomonadaceae</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

2.1.2. *P. aeruginosa*'nın Morfolojisi ve Kültür Özellikleri

P. aeruginosa, 0,6 x 2 µm boyutlarında, aerobik, hareketli ve spor oluşturmeyan gram negatif bir basildir. Tek başına, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde bulunabilir. Genellikle düzgün yuvarlak koloniler oluşturur (14). Hareket için tek bir polar flagellaya sahiptir. *P. aeruginosa* kolonileri koyun kanlı agarda sıklıkla beta hemoliz yapar ve yeşilimsi parlaklık gösterir. *P. aeruginosa* yaygın olarak kolonilere mavi renk veren piyosiyenin pigmenti (demir metabolizmasında görevlidir) ile sarı-yeşil bir pigment olan piyoverdini (floresan üreten ve düşük demirli ortamlarda bir siderofor görevi görür) üretir. *P. aeruginosa*, kolonilere kırmızı renk veren piyorubin veya kahverengi renk veren piyomelanin gibi suda çözünür diğer pigmentleri de üretebilir. Başka hiçbir gram negatif nonfermentatif bakteri piyosiyenin üretmediği için, bu özellik *P. aeruginosa* varlığının saptanmasında yardımcı olur. *P. aeruginosa*'nın en

belirgin özelliklerinden biri, organizma tarafından 2-amino asetofenon üretiminden kaynaklanan karakteristik meyvemsi veya üzüm benzeri kokusudur (15). *P. aeruginosa*, seçici olmayan besiyerlerinin çoğunda (Mueller Hinton agar, Nutrient agar, kanlı agar vb.) iyi ürer. *P. aeruginosa* 'yı seçici olarak üretmek amacıyla Cetrimide agarla birlikte King A veya King B agarda kullanılabilir (16).

2.1.3. *P. aeruginosa* 'nın Biyokimyasal Özellikleri

P. aeruginosa 'nın temel biyokimyasal özellikleri; katalaz ve oksidaz pozitifliği, koyun kanlı agarda β -hemoliz yapması, glukozdan oksidasyon yoluyla asit oluşturması, nitrat redüksiyonu, 42°C'de üreme özelliği, sitrat pozitifliği, asetamid kullanımı ve arginin dihidrolaz pozitifliğidir (17). Tıbbi önemi olan *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Tıbbi önemi olan *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri (13, 17)

<i>Pseudomonas</i> türleri ve biyokimyasal özellikler	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. mendocina</i>
Hareket	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oksidaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
42°C'de üreme	(+)	(-)	(+)	(+)/(-)	(+)
β -hemoliz	(+)	(+)	(+)/(-)	(-)	(-)
MacConkey agarda üreme	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Jelatinaz	(+)/(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Lesitinaz	(+)/(-)	(+)/(-)	(-)	(-)	(-)
H ₂ S üretimi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piyosiyanın	(+)/(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piyoverdin	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Nitrat redüksiyonu	(+)	(+)/(-)	(-)	(+)	(+)
Nitrattan gaz oluşumu	(+)/(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Arjinin dihidrolaz	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Lizin dekarboksilaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ornitin dekarboksilaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sitrat kullanımı	(+)	(+)	(+)	(+)/(-)	(+)
İndol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Üre	(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)
Asetamid kullanımı	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Maltozdan asit oluşturma	(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)	(-)
Laktozdan asit oluşturma	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mannitolden asit oluşturma	(+)/(-)	(+)	(+)/(-)	(+)/(-)	(-)
Eskülin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

2.1.4. *P. aeruginosa*'nın Patogenezi

P. aeruginosa, pili aracılığıyla mukozaya tutunup kolonize olur. Lipopolisakkarit (LPS), Toll like reseptör (TLR) aracılığıyla tanınır. TLR4 ve TLR9; Tip 3 sekresyon sistemini (T3SS) aktive eder. Bu durum, bakterinin gelişimi ve biyofilm oluşumuna yardımcı olur. Epitel hücrelerinin İnterlökin-8 (IL-8) salgılaması, proteazlar ve ekzotoksin A sayesinde nötrofil infiltrasyonu ve doku hasarı oluşur (18).

2.1.5. *P. aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

P. aeruginosa'nın virülans faktörleri, bakteriyel yüzey yapıları, salgılanan faktörler ve hücreden hücreye etkileşim faktörleri olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır. Bakteriyel yüzey yapıları; tip IV pili, LPS, aljinat ve flagella gibi yüzey uzantıları ile bazı sekresyon sistemlerini (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS ve T6SS) içerir. Sekresyon sistemleriyle toksinler ve proteazlar salgılanırken ortama bırakılan sinyal molekülleri ve hücreler arası iletişim sayesinde virülans faktörlerinin üretimi sağlanır (9).

2.1.5.1. Aljinat

Bir ekzopolisakkarit olan aljinat, hücre adezyonunda ve biyofilm oluşumunda görev alır. Aljinatın aşırı üretimi, KF hastalarından elde edilen çoğu klinik izolattaki mukoid fenotip için karakteristiktir. *P. aeruginosa* 'yı fagositozdan korur (21).

2.1.5.2. Kirpik (Flagella)

P. aeruginosa 'nın flagellası; yüzme (swimming) ve kayma (swarming) hareketi, biyofilm dağılımı ve konak hücreye adezyon gibi önemli roller oynamaktadır. Flagellanın yapısal bileşeni olan flagellin, konak hücrenin yüzeyindeki TLR5 tarafından tanınarak sitokin sentezinin artmasına neden olur ve kemotaksisi artırır (9, 19).

2.1.5.3. Tip IV Pili

Tip IV pili, bakterinin hücre yüzeyindeki GM-1 gangliozyd reseptörlerine tutunmasını sağlayan yüzey uzantısıdır (3, 13). Seğirme (twitching) ve kayma (swarming) hareketi, adezyon ve biyofilm oluşumundan sorumludur (20).

2.1.5.4. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit; lipid A, core (çekirdek) bölgesi ve O-polisakkarit zincirinden oluşan bir virülans faktörüdür. Lipid A, hidrofobik yapısı sayesinde LPS'in diğer iki parçasını dış membrana bağlayarak endotoksik aktiviteyle doku hasarına neden olur. Lipid A, konak hücrenin MD2 reseptörüne bağlanarak TLR4 sinyal yolağını aktive eder. LPS; hava yolu epitel hücrelerinde serbest oksijen radikalleri ve müsinin üretimini uyarır. Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), Interlökin-1 (IL-1), IL-6 ve Interferon- γ (IFN- γ)'yı uyararak pulmoner inflamasyonu indükler. LPS ayrıca antibiyotik direncine ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur (3).

2.1.5.5. Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)

Sekresyon sistemleri, bakteriyel molekülleri hücre zarının dışına taşıyabilen veya bu molekülleri konak hücreye enjekte edebilen yapılardır (22). *P. aeruginosa*'nın T3SS'i; bakteriyel hücre zarı, periplazmik boşluk, peptidoglikan tabakası, hücre dışı boşluk ve konakçı hücre zarını kapsayan protein yapıda bir makromoleküler yapıdan oluşur. Bu yapı, iğne kompleksi (needle complex), translokasyon aparatı (targeting apparatus) ve salgılanan toksinlerden (effector protein) oluşur. Bu yapıyı şaperonlar ve düzenleyici (regülatuar) proteinler destekler (23).

P. aeruginosa'nın T3SS'i, epitel hücre ve makrofaj hasarına katkıda bulunarak patogeneizde rol oynar. *P. aeruginosa*'nın T3SS ile aktarıldığı bilinen dört farklı efektörü tanımlanmıştır. Ekzotoksin U (ExoU), Ekzotoksin Y (ExoY), Ekzotoksin S (ExoS) ve Ekzotoksin T (ExoT) olarak adlandırılan bu efektörler, yara onarımını ve konak bağışıklığını engelleyerek kolonizasyonu artırır.

ExoU; nekroz, akut akciğer hasarı, sepsis ve mortalite ile ilişkili olup hastalık şiddeti üzerinde en büyük etkisi olan efektördür. Fosfolipaz A2 benzeri aktiviteye sahiptir. ExoY, hücre iskeletindeki aktin yapısını bozabilen konakçı faktöre bağımlı bir adenilat siklazdır. Aktinin mikrotübül yapısını bozarak endotel bariyer bütünlüğünün değişmesi ve akciğer hasarına neden olur. ExoT, guanozin trifosfataz aktive edici protein (GAP) ve adenozin difosfat ribozil transferaz (ADPRT) aktivitelerine sahip olup klinik izolatlarda en yaygın görülen efektördür. Fagositozu, fokal adezyonu ve hücre göçünü engeller. ExoS; ExoT gibi iki işlevli aktiviteye sahiptir, ExoT ile birlikte

apoptozu indükler ve DNA sentezini engeller. Pulmoner vasküler bariyerin bozulmasına neden olur. (3, 24).

2.1.5.6. Proteazlar

Serin proteaz (LasA) ve çinko metalloproteaz (LasB) isimli iki elastaz, akciğer parankimi ve damarlarda bulunan elastini parçalayarak akciğer fonksiyonlarını bozar ve pulmoner hemorajiye neden olur. Elastazlar ayrıca kompleman komponentlerini parçalar ve nötrofil kemotaksisini bozar (9, 25).

2.1.5.7. Sideroforlar

Demir şelasyonu, *P. aeruginosa* kronik enfeksiyonu patogenezinin hayati bir parçasıdır. Sideroforlar, demir birikimine yardımcı olmak için bakteriler tarafından salgılanan demir şelatlayıcı bileşiklerdir. *P. aeruginosa*, piyoverdin ve pyochelin adı verilen sideroforlar sayesinde transferrin ve laktoferrinden demirşelatlayabilir (9, 10). Piyosiyanin, Tip 2 sekresyon sistemi (T2SS) tarafından salgılanan mavi-yeşil pigmentli bir siderofordur. Hücre içi oksidatif stresi artırarak hücre parçalanmasına ve bakterinin biyofilm oluşturmaya katkı sağlar. Mukus oluşumunu ve IL-8 üretimini artırır, siliyer disfonksiyona neden olur (3, 10).

2.1.5.8. Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)

Quorum Sensing (QS) olarak bilinen bir hücre-hücre iletişim mekanizmasının, *P. aeruginosa*'daki virülans genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu sistemde çoğunluğu algılayan bakteriler bazı kimyasal sinyalleri üretilip serbest bırakırlar. Populasyon yoğunluğunun yüksek olduğu ortamda biriken bu sinyaller, virülans faktörlerinin sentezi için aynı kökenli reseptörlerle etkileşime girerek ilgili genlerin ekspresyonunu tetikler. *P. aeruginosa*'da Las, Iqs, Pqs ve Rhl'nin dahil olduğu karmaşık bir QS ağı mevcuttur. Las sistemi, diğer üç sistemi pozitif yönde kontrol eder ve sinyal hiyerarşisinin en üstünde yer alır. Benzer şekilde, Iqs sisteminin Pqs üzerinde ve Pqs sisteminin de Rhl sistemi üzerinde pozitif yönde uyarıcı bir etkisi vardır, ancak Rhl sistemi Pqs sistemini negatif yönde düzenler (26). QS; ayrıca *P. aeruginosa* 'da biyofilm olgunlaşmasının desteklenmesinde anahtar bir rol oynar (9, 26).

2.1.5.9. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, hücre dışı polimerik maddelerin oluşturduğu matriks içerisinde bulunan bakteri topluluğudur. Biyofilm oluşumu; sıcaklık değişimi veya besin yokluğu gibi beklenmedik koşullarda bakterilerin hayatta kalması için temel stratejilerden biridir. Biyofilm içerisindeki bakteriler, konak immün yanıtından kaçabilir ve antimikrobiyal direnç geliştirebilirler. *P. aeruginosa*'nın biyofilm matriksi; polisakkaritleri, ekstraselüler DNA'yı (eDNA), proteinleri ve lipidleri kapsar. Biyofilm kütlelerinin %90'ından fazlası matriksten oluşur. Matriks, yüzeylere yapışma için bir iskelet görevi görerek hücreden hücreye iletişimi sağlar. Psl, pel ve aljinat, ekzopolisakkarit yapıda olup biyofilmin yüzeye tutunması ve stabilitesinden sorumludurlar. Biyofilmdeki eDNA; bakteriler için besin kaynağı olarak, seğirme hareketi yoluyla hücresel organizasyonu sağlayarak ve dış zar üzerinde iki değerli katyonlarla etkileşime girerek virülansa katkı sağlar. eDNA ayrıca enfeksiyon bölgesinin asidik hale gelmesine neden olarak antimikrobiyal ajanların penetrasyonunu sınırlar. *P. aeruginosa*, biyofilm sayesinde tıbbi malzeme (üriner kateterler, implantlar, kontakt lensler vb.) yüzeylerinde kolonize olabilir. *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişim aşamaları Şekil 1'de açıklanmıştır (27).



Şekil 1: *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişim aşamaları (27)

2.1.5.10. Diğer Virülans Faktörleri

Alkalın proteaz, tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan bir virülans faktörüdür (9). Kompleman aktivasyonunu ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (10). Tip IV proteaz, konakçı dokulara zarar verir ve fibrinojen, laktoferrin, transferrin ve elastini parçalayıp konak dokularını hasara uğratarak bakteriyel enfeksiyonu artırır. Tip IV proteaz aynı zamanda sürfaktan proteinlerini (SP-A, SP-B ve SP-D) parçalar ve korneal enfeksiyondaki virülansa katkı sağlar (3, 9). Ekzotoksin A (ExoA), *P. aeruginosa*'nın toksisitesi en yüksek olan virülans faktörüdür. ExoA, ADPRT yapısında olup T2SS yoluyla hücre dışına salgılanır. Elongasyon (uzama) faktör-2'yi (EF-2) etkisiz hale getirerek protein sentezini inhibe eder. Yanıklarda, korneada ve kronik akciğer enfeksiyonundaki doku hasarında rol oynar (3, 25). Fosfolipaz C, T2SS ile salgılanarak membran fosfolipitlerini ve sfingomiyelini yıkar (3). Ayrıca akciğerde sürfaktanı yıkar ve opsoninleri inaktive eder (9, 13). Ramnolipid, sürfaktanı ve solunum epitelindeki sıkı bağlantıları bozar, biyofilmlerin gelişimini destekler (3, 28). Lektin A, *P. aeruginosa*'nın konakçı dokudaki galaktoza bağlanmasını sağlayarak epitel hücresi adezyonuna yardımcı olan bir proteindir (16). Lökosidin, nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarının inhibisyonunu sağlar (13). Lipaz, *P. aeruginosa*'nın T2SS'i tarafından salgılanır. Major sürfaktan lipidi olan dipalmitoilfosfatidilkolini ve hücre zarını bozarak dokulara zarar verir (9). *P. aeruginosa*'daki virülans faktörleri ve ilişkili sekresyon sistemleri Tablo 3'te açıklanmıştır.

Tablo 3. *P. aeruginosa*'daki virülans faktörleri ve ilişkili sekresyon sistemleri (3, 18, 21)

Sekresyon sistemi	Virülans faktörü
T1SS	Alkalın proteaz
T2SS	LasA ve LasB (Elastaz)
	Fosfolipaz C
	Ekzotoksin A
	Lipaz
	Piyosiyenin
	Tip IV proteaz
	ExoS
T3SS	ExoY
	ExoT
	ExoU
	Piyoverdin
Diğer sekresyon sistemleri	Ramnolipid
	Lektin A

2.1.6. *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi

P. aeruginosa; solunum ekipmanları, temizlik solüsyonları, lavabolar ve paspaslar gibi nemli ortamlarda üreyebilir. *P. aeruginosa* ayrıca yüzme havuzları, jakuziler ve kontakt lens solüsyonları gibi hastane dışındaki nemli ortamlarda da bulunabilir (29). *P. aeruginosa*, VİP vakalarındaki izolatların %10-20'sini oluşturur ve *Staphylococcus aureus*'tan sonra ikinci sırada gelir. *P. aeruginosa*, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının (ÜSE) ve kateterle ilişkili ÜSE'nin de yaygın bir nedenidir. *P. aeruginosa*, yanık hastalarında enfeksiyona yol açan en yaygın gram negatif organizmadır. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) da yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilidir. KF veya bronşektazisi olan bireylerde *P. aeruginosa*'nın aljinat üretimi sonucu oluşan mukoid fenotipin gelişimi, akciğer fonksiyonundaki azalma ve artmış mortalite ile ilişkilidir. *P. aeruginosa*; steroid kullanan, nötropeni veya hematolojik malignitesi olan hastalarda da önemli bir patojendir. *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal direnç ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Özellikle karbapenem dirençli olan izolatların %90'ından fazlasında sağlık hizmeti öyküsünün olması, nozokomiyal enfeksiyonlarda *P. aeruginosa*'nın önemli bir patojen olduğunu göstermektedir (30).

2.1.7. *P. aeruginosa* Enfeksiyonları

P. aeruginosa, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen, ayrıca epitel bariyer bütünlüğünün ve mukosiliyer klirensin bozulması ya da tıbbi cihazların kullanımı sonucu normal fizyolojik fonksiyonun değiştiği durumlarda geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahip olabilmektedir (31).

2.1.7.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları; asemptomatik kolonizasyon, trakeobronşit ve ciddi nekrotizan bronkopnömoni gibi hastalıklarla ilişkilidir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanılması veya mikroorganizmayı alt solunum yollarına taşıyan mekanik solunum cihazlarının kullanılması, immün sistemi bozuk olan hastaları enfeksiyona yatkın hale getirir (25). Akciğer nakli olan hastaların *P. aeruginosa* ile kolonizasyonu sonucu kronik akciğer rejeksiyonu ile seyreden bronşiyolit obliterans sendromu gelişebilir (32).

2.1.7.2. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

P. aeruginosa, ciddi yanıklarda ve yara enfeksiyonlarında en sık izole edilen bakteridir. Postoperatif yara enfeksiyonlarında nozokomiyal *P. aeruginosa* salgınları bildirilmiş olup ÇİD *P. aeruginosa*'nın neden olduğu yara enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilendirilmiştir (31). *P. aeruginosa*, ayakta delici yaralanma sonrası gelişen osteokondritlerin de en sık nedenidir. Nekrotik deri lezyonu (ektima gangrenosum) ile karakterize olabilir (25). Şiddetli diyabetik ayak enfeksiyonlarında osteomiyelite neden olabilir (17).

2.1.7.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu ÜSE, genellikle kateterizasyon veya cerrahiye sekonder olarak ortaya çıkar. Üriner sistem kateterizasyonu, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu nozokomiyal ÜSE'nin ana sebebidir. Kateterin yerleştirilmesi epitel katmanlarını bozarak biyofilm oluşumu sayesinde bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştırır (31).

2.1.7.4. Kulak Enfeksiyonları

P. aeruginosa, yüzücü kulağı adı verilen ve kontamine yüzme havuzlarının önemli bir faktör olduğu eksternal otit ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (31). Malign eksternal otit ise daha çok diyabetik yaşlı hastalarda görülen bir formdur. *P. aeruginosa* ayrıca kronik otitis media ile de ilişkilidir (25).

2.1.7.5. Göz Enfeksiyonları

Göz enfeksiyonları, korneadaki travma sonrası *P. aeruginosa* ile kontamine olmuş suyla temas sonucu gelişir. Tedavi edilmezse korneal ülserler gelişebilir (25). Kontakt lens kullanıcıları, *P. aeruginosa* keratiti açısından risk altındadır (17).

2.1.7.6. Diğer Enfeksiyonlar

P. aeruginosa enfeksiyonuna bağlı olarak travma veya cerrahi sonrası menenjit ve intravenöz ilaç kullanımına bağlı endokardit gözlenebilir. Yenidoğanlarda sepsis ve menenjite sebep olabilir (17, 33). *P. aeruginosa* bakteriyemisinde, primer enfeksiyon

alanından diğer organ ve dokulara yayılım gözlenebilir (25).

2.1.8. *P. aeruginosa*'nın Genom Yapısı ve Yüksek Riskli Klonlar

P. aeruginosa'nın tam genom dizilimi, ilk kez 1950'lerde Avustralyalı bir hastanın yarısından izole edilen PAO1 suşu için yapılmıştır. *P. aeruginosa*'nın genom yapısı; çekirdek (core) genom, aksesuar genom ve pan genom yapılarından oluşmaktadır. Çekirdek genom tüm *P. aeruginosa* suşlarının sahip olduğu genom bölgesini tanımlar. Aksesuar genom ise çeşitli mekanizmalarla entegrasyonun olduğu alanlardır. Bir sınıf içindeki tüm suşlar için tüm gen seti ise pan genom olarak tanımlanmaktadır. Pan genom, çekirdek genom ve aksesuar genomdan oluşan dairesel bir kromozomal yapıya sahiptir. Çekirdek genom bölgesi, farklı suşlar arasında düşük düzeyde genetik çeşitlilik sergiler ve genom yapısının %90'ını oluşturur. Bu bölgedeki mutasyonların sağkalımı etkilemesi nedeniyle aşırı değişiklikleri kabul etmez (20). Aksesuar genom, genellikle ekstrakromozomal olan, korunmamış, değişken uzunluklu ve belirli lokuslarda yerleşmiş DNA bloklarından oluşur. Aksesuar genom bakteriyofajlardan, transpozonlardan ya da diğer suş ve türlerden plazmidlerin entegrasyonu ile dinamik değişiklikleri kabul edebilir. Aksesuar genom, virülans faktörlerini kodlayan genleri barındırması nedeniyle patojenite adaları olarak adlandırılır. Örneğin, *P. aeruginosa* patojenite adası PAPI-2'nin, artan virülansla bağlantılı bir tip 3 sekresyon sistemi efektör proteini olan ExoU'yu kodlayan geni içerdiği bilinmektedir. Dışa atım pompaları ve β -laktamaz üretimi gibi intrinsek özellikler çekirdek genomda bulunmasına rağmen, kazanılmış antibiyotik direnç genleri aksesuar genomdadır. Bu nedenle ÇİD *P. aeruginosa* suşlarının yayılması, genellikle aksesuar genomda bulunan direnç genlerine bağlıdır (20, 35).

Dünya çapında birçok hastanede ÇİD ya da yaygın dirençli (XDR) *P. aeruginosa* suşları için salgın raporları mevcuttur. Klonal çeşitliliğin artması yüksek riskli klonlar olarak da adlandırılan ÇİD/XDR *P. aeruginosa*'nın dünya çapında yaygınlaşmasına neden olmuştur. Üç ana yüksek riskli klon arasında, O11 serotipiyle ilişkili ST235, en yaygın olanıdır. ST235 beş kıtanın tamamında, ST111 (serotip O12) dünya genelinde, ST175 (serotip O4) birçok Avrupa ülkesinde yaygın olarak görülmektedir. ST235 ve ST111 klonlarında GSBL ve metallobetalaktamazlar (MBL)

sık olarak görülür (36, 37). ExoU (+) / ExoS (-) olan ST235 klonu yüksek ölüm oranları ile ilişkilirken, ExoU (-) / ExoS (+) olan ST175'in öldürücülüğü düşüktür. Üç ana yüksek riskli klonun (ST111, ST175 ve ST235) motilite ve pigment (piyoverdin ve piyosiyenin) üretiminde kusurlu olduğu ve biyofilm üretiminin bu klonlarda artmış olduğu gözlenmiştir. Liverpool Epidemik Suşu (LES) ise, ST146 olarak bilinen ve KF hastalarını kolonize eden yüksek riskli bir klondur (37).

2.1.9. *P. aeruginosa*'nın Laboratuvar Tanısı

P. aeruginosa'nın tanısı için gerekli özellikler; oksidaz pozitif gram negatif basillerin görülmesi, tipik üzüksü meyve kokusu, kanlı agarda mukoid ya da pürüzlü (R tipi) koloni morfolojisi veya pigmentli β -hemolitik koloniler görülmesidir. Tanıda bu konvansiyonel testlerle ön tanımlamadan sonra Vitek (bioMérieux) ve Phoenix (BD Diagnostic Systems) gibi otomatize sistemler, Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) veya 16S rRNA gen dizilemesi kullanılabilir (13).

2.1.10. *P. aeruginosa*'nın Tedavisi

P. aeruginosa tedavisinde BL/BLİ kombinasyonları (piperasilin tazobaktam), üçüncü kuşak (seftazidim, sefoperazon) ve dördüncü kuşak (sefepim) sefalosporinler, Sefiderokol, monobaktamlar (aztreonam), florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin, delafloksasin), fosfomisin, karbapenemler (imipenem/silastatin, meropenem, doripenem), aminoglikozidler (tobramisin, gentamisin, amikasin, plazomisin), kolistin ve yeni BL/BLİ kombinasyonları (seftazidim avibaktam, seftolozan tazobaktam, imipenem/silastatin relebaktam, meropenem vaborbaktam) kullanılmaktadır. Etkinliği artırmak ve direncin ortaya çıkmasını engellemek için farklı sınıftaki antibiyotikler birlikte kullanılabilir (38, 39).

2.1.11. *P. aeruginosa*'da Antimikrobiyal Direnç

P. aeruginosa'nın antimikrobiyal direncinden intrensek, kazanılmış ve adaptif mekanizmalar sorumludur. Dirençli fenotiplerde farklı mekanizmalar aynı anda mevcut

olabilir. OprD porin eksikliği, dışa atım pompalarının aşırı üretimi, AmpC β -laktamaz, GSBL ve karbapenemazların üretimi $\text{\text{C}}\text{\text{I}}\text{\text{D}}$ *P. aeruginosa* fenotiplerinin ortaya çıkmasına neden olur. $\text{\text{C}}\text{\text{I}}\text{\text{D}}$ *P. aeruginosa*, üç veya daha fazla antibiyotik grubundan en az bir ajana karşı dirençli izolatlar olarak tanımlanırken, XDR *P. aeruginosa*; birkaç antibiyotik haricinde tüm antibiyotiklere dirençli izolatlar olarak tanımlanır. Bu tanımlar, yeni BL/BLI kombinasyonları kullanılmadan önce yapılmıştır. Bu nedenle, son zamanlarda piperasilin tazobaktam, CTZ, sefepim, aztreonam, meropenem (MEM), imipenem/silastatin, siprofloksasin ve levofloksasine dirençli olan, ancak yeni BL/BLI kombinasyonlarına ve kolistine karşı duyarlı olan *P. aeruginosa* suşları için tedavisi zor dirençli (DTR) *P. aeruginosa* adında yeni bir tanım önerilmiştir. Küresel SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı'na göre çoklu ilaca dirençli ($\text{\text{C}}\text{\text{I}}\text{\text{D}}$) *P. aeruginosa* oranı %25 civarındadır. 2017'de WHO, CRPA'nın araştırma ve geliştirme için kritik ve küresel öncelikli patojen olarak belirttiği bir liste yayınlamıştır (40, 87).

İntrinsik antibiyotik direnci, toksik moleküllere ve antimikrobiyallere karşı bakteriye koruma sağlayan, yapısal veya fonksiyonel özellikler yoluyla belirli bir antibiyotiğin etkinliğini azaltan özelliktir. Porinler, besinlerin ve bazı hidrofilik antibiyotiklerin (β -laktamlar, aminoglikozidler, tetrasiklinler ve bazı florokinolonlar) taşınmasında önemli rol oynayan proteinlerdir. *P. aeruginosa*'da intrensek direnç mekanizmalarından biri, porin proteinlerinin sayısının azaltılması ve porinlerin yalnızca gerekli besinlerin geçişini sağlayan spesifik kanallarla değiştirilerek dış zar geçirgenliğinin azalması yoluyla hidrofilik antibiyotiklerin girişinin sınırlandırılmasıdır. Başka bir intrensek direnç mekanizması da dışa atım pompalarıdır (20, 21).

P. aeruginosa'da indüklenebilir ve kromozomal olarak kodlanmış β -laktamaz olan AmpC'nin üretimi, intrensek direnci sağlayan bir diğer mekanizmadır. AmpC β -laktamazlar aktif katalitik bölgesinde serin kalıntısı içeren Ambler sınıf C β -laktamazlardır. Normalde düzenleyici bir protein olan AmpR, AmpC β -laktamaz ekspresyonunu çok düşük seviyelerde tutar. Bazı β -laktamlar, degrade olan hücre duvarı ürünlerinin üretimini indükler. Oluşan bu ürünler, AmpR'ye bağlanan UDP-N-asetilmuramik asit peptidi ile rekabete girerek AmpR'de konformasyonel değişikliğe neden olur ve AmpC'nin üretimini artırır. Aminopenisilinler, amoksisilin klavulanat, birinci nesil sefalosporinler ve sefamisinler (sefoksitin) AmpC üretiminin güçlü indükleyicileridirler. Piperasilin tazobaktam (TZP), aztreonam ve üçüncü nesil

sefalosporinler ise zayıf indükleyicilerdir, yeterli β -laktamaz üretildiği takdirde hidrolize uğrayabilirler. Sefepim (zayıf indükleyici) ve imipenem (güçlü indükleyici) kararlı bir açıl enzim kompleksi oluşturmaları nedeniyle AmpC β -laktamazların hidrolizine karşı kararlı yapıda kalabilir. TZP ve sefepimin AmpC üreten suşlara karşı etkinliği tartışmalıdır. Karbapenemlerle yeni BL/BLI'ler (seftazidim avibaktam, meropenem vaborbaktam vb.) AmpC üreten *P. aeruginosa* izolatlarına karşı tedavide kullanılabilen ajanlardandır (41).

P. aeruginosa, glikopeptid antibiyotiklere, daptomisine, linezolid, makrolidlere, klindamisine, streptograminlere, rifampine, trimetoprim sulfametoksazole, tetrasikline, aminopenisilinlere ve bunların β -laktamaz inhibitörleri kombinasyonlarına, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere ve oral kullanılan üçüncü kuşak sefalosporinlere intrinsik olarak dirençlidir (16).

Kazanılmış direnç, antibiyotik maruziyetinin bir sonucu olarak kromozomal genetik mutasyonlara veya genetik elementlerin (plazmidler, transpozonlar, integronlar vb.) horizontal transferiyle edinilen dirençtir. Horizontal gen transferi; transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon ile gerçekleşir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda GSBL'ler, karbapenemazlar, aminoglikozid modifiye edici enzimler ve 16S rRNA metilazlar için horizontal gen transferi yoluyla *P.aeruginosa* direnci rapor edilmiştir. Penisilin bağlayıcı proteinlerdeki (PBP) özgül modifikasyonlar, β -laktamlara duyarlılığın azalmasına yol açabilir, ancak bu mekanizma gram pozitif bakterilere kıyasla daha az görülür. PBP1'deki değişiklikler genellikle sefalosporinler için, PBP2'deki değişiklikler sefalosporinler ve karbapenemler için, PBP3'teki değişiklikler imipenem (IPM) için, PBP4'teki değişiklikler ise IPM ve MEM etkinliği için önemlidir. Polimiksin ailesinden bir antibiyotik olan kolistine direnç, mcr-1 geninin plazmid aracılı mobilizasyonu yoluyla edinilir. Kinolon hedef bölgelerinin modifikasyonu da bir kazanılmış direnç mekanizmasıdır. Kinolonlar, DNA giraz ve topoizomera IV'ü hedefleyerek bakteriyel DNA replikasyonunu inhibe eder. DNA giraz ve topoizomera IV'ü kodlayan gyrA-gyrB ve parC-parE genlerinde mutasyon meydana geldiğinde, kodlanan proteinlerin kinolonlara bağlanma afinitesinde azalma meydana gelir. Bu durum *P. aeruginosa*'da kinolonlara karşı dirençle sonuçlanır. *P. aeruginosa*'da kazanılmış direnç mekanizmalarından biri de, karbapenemlere olan dirençtir. OprD geninde gelişen mutasyonsonucunda OprD ifadesi azalır ve karbapenemlere karşı

yüksek direnç ortaya çıkar. *P. aeruginosa*'da kazanılmış direncin başka bir örneği, antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin aşırı ekspresyonuna neden olan mutasyonlardır. *P. aeruginosa*'da AmpC gen mutasyonu sonucu AmpC'nin aşırı ekspresyonu gerçekleşir. Buna bağlı olarak, β -laktamazların aşırı üretimi ve sefalosporinlere karşı yüksek direnç oranı görülür (16, 20, 21).

Adaptif direnç ise hücrede düzenleyici olayları tetikleyen büyüme koşullarına bağlıdır. Adaptif direnç temel olarak çevresel stresler ve özgül antibiyotiklerin varlığı ile indüklenir. Dış uyaranların ortadan kaldırılmasıyla duyarlılık durumu eski haline döner. *P. aeruginosa*'da en iyi karakterize edilen adaptif direnç mekanizması; polimiksinlere, aminoglikozidlere ve katyonik antimikrobiyal peptidlere karşı direncin gelişmesiyle ilişkili biyofilm oluşumu ve LPS'nin yapısal değişikliğidir (20).

2.2. Karbapenem Direnci

Karbapenemler, bakteri hücre duvarındaki PBP'lere bağlanarak etki gösteren bakterisidal etkili β -laktam antibiyotiklerdir. Konsantrasyondan bağımsız öldürme etkisine sahip olup gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterilere etkilidirler. KİAE, deri enfeksiyonları, nozokomiyal pnömoniler, KÜSE, menenjit ve febril nötropeni gibi durumlarda kullanılırlar. Ertapenemin *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliği sınırlıdır (42).

P. aeruginosa'da karbapenem direncinin temel mekanizmaları; porin kaybıyla birlikte aşırı üretilmiş AmpC β -laktamazların varlığı, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve karbapenemazların üretimidir (43).

2.2.1. Karbapenemazlar

Karbapenemazlar ve diğer β -laktamazlar; fonksiyonel ve moleküler olarak sınıflandırılırlar. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırması; substrat hidrolizi ve β -laktamaz inhibitörleriyle inaktivasyon özelliklerini ölçüt alır. Karbapenemazlar, Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre grup 2df, 2f ve 3'te bulunurlar (47). Beta laktamazların sınıflandırılması Tablo 4'te açıklanmıştır.

Tablo 4. Beta laktamazların sınıflandırılması (44-46)

Fonksiyonel Mekanizma	Sınıflama		Enzim	Substrat	İnhibitör karakteristiği
	Bush Jacoby	Ambler			
Serin	1	C	AmpC, CMY-1, ACT-1, FOX-1, MIR-1	Sefamisinler, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	CA ve TZB ile inhibisyona dirençli
	2a	A	PC1	Penisilinler	CA ve TZB ile inhibe olur
	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinler	CA ve TZB ile inhibe olur
	2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER-1, VEB-1	Penisilinler, oksiiminosefalosporinler (sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim), monobaktamlar	CA ve TZB ile inhibe olur
	2br	A	TEM-30, SHV-10	Penisilinler	CA, SB ve TZB ile inhibisyona dirençli
	2ber	A	TEM-50, TEM-158	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	CA, SB ve TZB ile inhibisyona dirençli
	2c	A	PSE-1, CARB-3	Penisilinler, karbenisilin	CA ve TZB ile inhibe olur
	2ce	A	RTG-4	Karbenisilin, Sefepim	CA ve TZB ile inhibe olur
	2d	D	OXA-1, OXA-10	Kloksasilin	Değişken
	2de	D	OXA-11, OXA-15	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Değişken
	2df	D	OXA-23, OXA-48	Kloksasilin, oksasilin, karbapenemler	Değişken
	2e	A	CepA	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	CA ile inhibe olur
	2f	A	KPC, GES, IMI-1, SME	Karbapenemler, sefamisinler, oksiiminosefalosporinler	Değişken
Metallo (Çinko)	3	B	IMP, VIM, NDM	Monobaktamlar hariç tüm beta laktamlar	CA, SB ve TZB ile inhibisyona dirençli, EDTA ile inhibe olur.

CA: Klavulanik asit, SB: Sulbaktam, TZB: Tazobaktam, EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

Grup 1 β -laktamazlar, sefalosporinler üzerinde benzilpenisiline göre daha aktif etki gösteren sefalosporinazları içerir. Moleküler sınıf C'ye ait enzimlerdir. BL/BLI kombinasyonlarına, penisilinlere, sefamisinlere, birinci, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama dirençlidir. Kromozomal AmpC sefalosporinazlar *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ve *P. aeruginosa* gibi birçok organizmada düşük miktarda eksprese edilir; ancak amoksisilin, ampisilin, IPM

gibi β -laktamlara maruz kalındığında bu enzimlerin üretimi indüklenmektedir. CMY, ACT, DHA, FOX ve MIR gibi grup 1 β -laktamazlar plazmid aracılığıyla aktarılabilir (47-49). Grup 2 β -laktamazlar, en büyük β -laktamaz grubu olup plazmid yoluyla aktarılabilir. Moleküler sınıf A ve D'ye ait enzimlerdir. Grup 2a; *Staphylococcus spp.* gibi gram pozitif bakterilerin penisilinazlarını içerir. Grup 2b; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize eden; ancak klavulanik asit (CA), sulbaktam (SB) ve tazobaktam (TZB) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilen β -laktamazları içerir. Grup 2b'nin en iyi bilinen üyeleri TEM ve SHV'dir. Bir alt grup olan Grup 2be; TEM, SHV, CTX-M, PER ve VEB gibi GSBL'leri içerir. Grup 2c, karbenisilin ve tikarsilini benzilpenisiline göre daha fazla hidrolize eden; CA ve TZB tarafından inhibe edilen penisilinazları kapsar. Grup 2d, kloksasilin ve oksasilini hidrolize eden oxacillinase (OXA) tipi β -laktamazları içerir. Grup 2e, genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğine sahip olan sefalosporinazlardır; CA veya TZB tarafından inhibe edilir. Grup 2f, karbapenemleri hidrolize edebilen β -laktamazları içerir (47, 49, 50). Grup 3 β -laktamazlar; monobaktamlar hariç tüm β -laktam antibiyotikleri hidrolize eden MBL'lerdir. CA, TZB ve SB gibi β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir, ancak etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) tarafından inhibe edilebilir (50, 51). Daha yaygın kullanılan Ambler sınıflandırmasına göre; A, C ve D sınıfı β -laktamazlar aktif bölgelerinde serin bulundururken, sınıf B'nin tümü aktif bölgesinde çinko bulunduran metalloenzimler olarak tanımlanır (47, 52).

2.2.1.1. Sınıf A Karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemaz grubu; *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), Non metallo carbapenemase (NMC), Imipenem hydrolysing β -lactamase (IMI), *Serratia marcescens* enzyme (SME) ve Guiana extended spectrum (GES) enzimlerini içerir (53). NMC, IMI ve SME enzimleri genellikle kromozomal olarak kodlanırken, KPC ve GES enzimleri plazmid tarafından kodlanır. NMC, IMI ve SME kromozomal olarak kodlanması nedeniyle dünya çapında nadir olarak rapor edilmiştir (54). KPC, aktarılabilir plazmidlerde bulunur ve *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de yaygın olarak görülür. GES enzimlerini kodlayan genler ise, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'da aktarılabilir plazmidler üzerindeki integronlarda bulunur (54, 55).

SME karbapenemazlar, *bla*SME geninin yer aldığı *S. marcescens* izolatlarında bildirilmiştir. SME eksprese eden izolatların tanımlayıcı bir özelliği, karbapenemlere dirençli olup CTZ gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı olmalarıdır (56). IMI ve NmcA, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Fransız Polinezyası'nda *E. cloacae* izolatlarında saptanmıştır. NmcA ve IMI-1 kromozomal olarak, IMI-2 plazmid tarafından kodlanan karbapenemazlardır (57).

KPC ilk olarak 1996 yılında Kuzey Carolina bölgesindeki bir *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir. KPC, başta *K. pneumoniae* olmak üzere diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de bulunabilir. KPC karbapenemazlar sefalosporinlere, monobaktamlara ve karbapenemlere etkilidir. CA ve TZB tarafından inhibe edilemezler; ancak avibaktam, relebaktam ve vaborbaktam gibi yeni β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilirler (56-59). En sık bildirilen varyantlar KPC-2 ve KPC-3'tür (60).

GES, ilk kez 1998 yılında Fransız Guyanası'nda bir *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır. GES-1, -2, -4 ve -5, karbapenemlere karşı enzimatik aktivite gösterir. 2001 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında GES-2'nin rapor edilmesiyle hidroliz spektrumları IPM'i içerecek şekilde genişletilmiştir. GES karbapenemazlar esas olarak *P. aeruginosa*'da bulunmakla birlikte *Enterobacteriaceae* üyelerinde de gözlenebilir. GES-5 üreten *P. aeruginosa* izolatları Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir (4, 52, 58).

2.2.1.2. Sınıf B Karbapenemazlar

Sınıf B karbapenemazlar (MBL), aztreonam dışında tüm β -laktamları hidrolize edebilir ve aktif bölgesinde çinko bulundurur. MBL'ler EDTA tarafından inhibe edilebilir. MBL genleri; integron, transpozon, plazmid veya kromozom üzerinde bulunabilir. *P. aeruginosa* da dahil olmak üzere çeşitli bakteri türlerinde tanımlanmıştır (56).

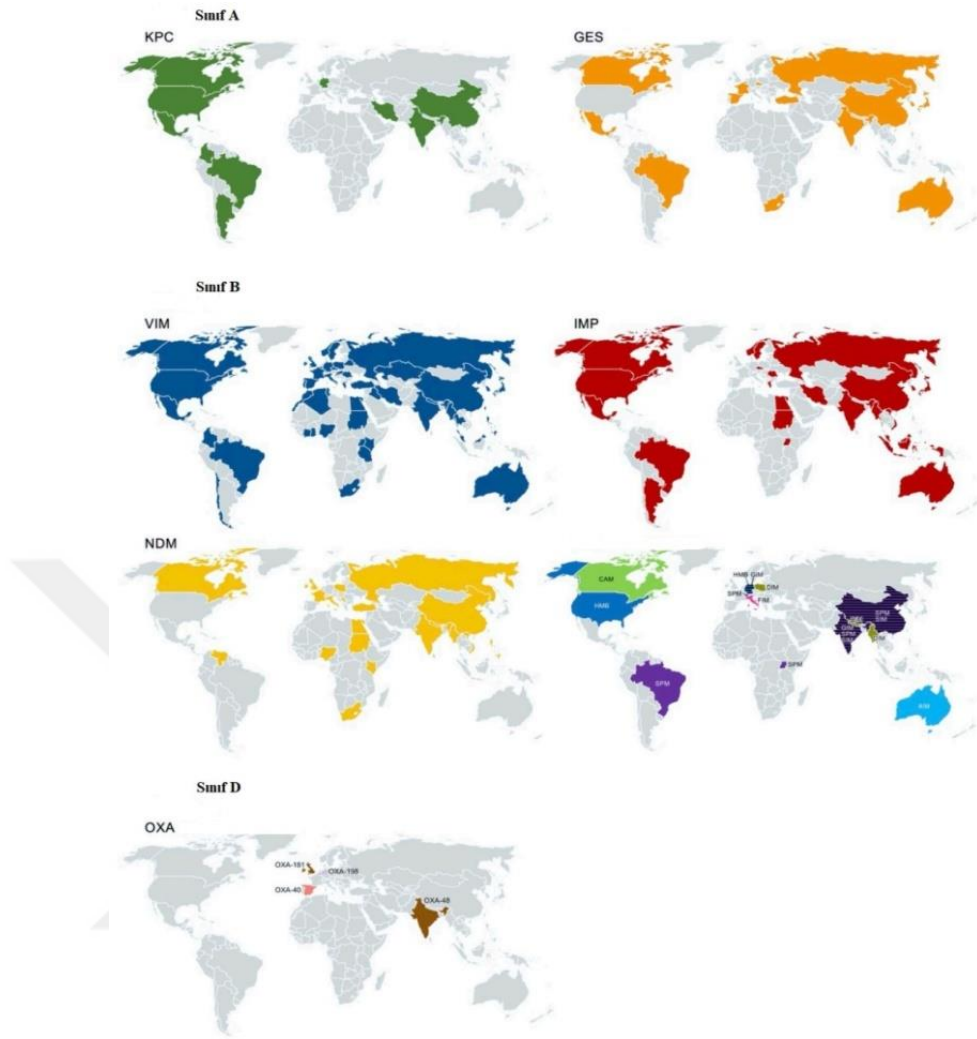
Verona integron-encoded MBL (VIM), *P. aeruginosa*'da dünya çapında en sık tanımlanan karbapenemazdır (4, 63). Bunların dışında New Delhi MBL (NDM), Sao Paulo MBL (SPM), Seul imipenemazı (SIM), Adelaide Imipenemase (AIM) ve German imipenemase (GIM) da rapor edilmiştir (56, 61, 62). Imipenemase (IMP), *P. aeruginosa* tarafından üretilen en yaygın ikinci karbapenemazdır. İlk olarak 1988 yılında

Japonya'daki bir *P. aeruginosa* izolatında raporlanmıştır. IMP-1, *E. coli*, *K. pneumoniae*, ve *A. baumannii*'de de tespit edilmiş; bu durumun plazmid üzerindeki sınıf 1 integronlarla horizontal olarak gen transferi sonucunda oluştuğu saptanmıştır. IMP-1'in bir aminoasit değişikliği ile oluşan IMP-6, MEM direncini artırmıştır (4, 64, 65). VIM tipi karbapenemazlar da IMP gibi sınıf 1 integronlarda yerleşmiştir. VIM-1 ilk olarak 1999 yılında Verona'da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. Günümüzde VIM-2, *P. aeruginosa*'da en yaygın görülen MBL'dir ve birçok salgının sebebi olmuştur. NDM-1, ilk olarak 2009 yılında Yeni Delhi'de *K. pneumoniae* ve *E. coli*'den izole edilmiştir. NDM-1 üreten *P. aeruginosa* suşları ise ilk olarak 2011 yılında Sırbistan'dan rapor edilmiştir (65). SPM-1 üreten *P. aeruginosa* ilk kez 2001 yılında Brezilya'nın Sao Paulo kentindeki bir izolatta saptanmıştır. SPM-1 plazmid üzerinde yer alır ve Güney Amerika bölgesinde VIM ile beraber hakim olan karbapenemazdır. GIM-1, 2002 yılında Almanya'da tanımlanmış bir karbapenemazdır. GIM-1, IMP ve VIM'e benzer şekilde plazmid üzerindeki sınıf 1 integronlarda yer alır. SIM üreten *P. aeruginosa* Çin'de ve AIM üreten *P. aeruginosa* Avustralya'da tanımlanan diğer MBL'lerdir (4, 66).

2.2.1.2. Sınıf D Karbapenemazlar

Sınıf D karbapenemazlar, birkaç istisna dışında CA, TZB ve SB tarafından inhibe edilmezler. Sınıf D karbapenemazlar, CRAB'nin karbapenem direncinden sorumlu plazmid kodlu β -laktamazlarının (OXA-23, OXA-40 ve OXA-58) ve kromozomal kodlu β -laktamazların (OXA-51) tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır (67). 2001 yılında Türkiye'deki karbapenem dirençli bir *K. pneumoniae* izolatından plazmid yerleşimli OXA-48 tanımlanmıştır. Bu ilk OXA-48 üreten izolat; geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, monobaktamlar ve karbapenemler dahil olmak üzere tüm β -laktamlara karşı yüksek düzeyde direnç göstermiştir (68, 69).

OXA tipi karbapenemazlar, *P. aeruginosa*'da nadiren görülür. İspanya'da OXA-40, Hindistan'da OXA-48, Birleşik Krallık'ta OXA-181 ve Belçika'da OXA-198 üreten *P. aeruginosa* suşları tanımlanmıştır (4). 2021 yılında karbapenemaz üreten *P. aeruginosa*'nın dünyadaki dağılımı Şekil 2'te gösterilmiştir.



Şekil 2. 2021 yılında karbapenemaz üreten *P. aeruginosa*'nın dünyadaki dağılımı (4)

2.2.2. Dış Membran Porin Defekti

Gram negatif bakterilerin dış zarları, antibiyotiklerin ve birçok hidrofilik maddenin geçişini sağlayan porin proteinlerini içerir. Bakteriler karbapenemlerin, PBP'lerin bulunduğu periplazmik boşluğa girişini sınırlayabilir. Bu mekanizma porin ekspresyonunun modifikasyonu veya porin kodlayan gendeki değişikliklerle ilgilidir. *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemlere karşı direncin ana mekanizmalarından biri, OprD porini kodlayan genin down regülasyonudur. OprD miktarındaki azalma, bakterinin IPM ve MEM'e duyarlılığının azalmasına neden olur (44, 70, 71). OprD genindeki nokta mutasyonlar, çerçeve kaymaları veya büyük delesyonlar karbapenem direncine katkıda bulunur (38). Yapılan bir çalışmada OprD kaybının *P.aeruginosa*'nın MEM duyarlılığını 4-32 kat, IPM duyarlılığını 4-16 kat azalttığı gösterilmiştir (72).

2.3. Karbapenem Dirençli *P. aeruginosa*'da Kullanılan Ajanlar

Karbapenemaz üreten patojenlerin (karbapenem dirençli *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Enterobacteriaceae*) yayılması büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu sebeple CZA, CT, imipenem relebaktam, sefiderokol ve kolistin gibi antimikrobiyal ajanlar, CRPA enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (79-81).

2.3.1. Seftazidim Avibaktam

CZA; KİAE, KÜSE ve VİP tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmış bir BL/BLİ kombinasyonudur. CTZ, *P. aeruginosa* dahil olmak üzere gram negatif basillere karşı geniş spektruma sahip olan üçüncü kuşak bir sefalosporindir. Avibaktam ise, KPC ve birçok GSBL'nin de dahil olduğu sınıf A β -laktamazları, sınıf C β -laktamazları (AmpC) ve OXA-48'in dahil olduğu sınıf D β -laktamazları inhibe eden bir non-BL/BLİ'dir. Ancak NDM ve VIM gibi MBL'lere karşı etkisizdir (82-84). CZA'nın aztreonam ile kombine olarak kullanılması, MBL üreten suşlara karşı etkinliğini artırır (83).

CZA'ya karşı en yaygın direnç mekanizmaları; sınıf B karbapenemazların varlığı, dışa atım pompasındaki artan aktivite, porin kaybı ve KPC genindeki mutasyonlardır. Ayrıca, PBP2 ve PBP3'teki tek nokta mutasyonları, avibaktam ile geri döndürülemeyen CTZ direnci ile ilişkilidir. Avibaktamın *P. aeruginosa* suşları için güçlü AmpC indüksiyonuna neden olması, CZA direncinin başka bir sebebidir (85, 86).

2.3.2. Seftolozan Tazobaktam

CT, ÇİD *P. aeruginosa*'nın da içinde olduğu gram negatif mikroorganizmalara karşı etkili bir BL/BLİ'dir. 2014 yılında FDA tarafından KİAE, VİP ve KÜSE tedavi endikasyonu için onaylanmıştır (87). MBL'ler, KPC, GES ve OXA tipi β -laktamazlara etkisizdir. Seftolozanın *P. aeruginosa*'nın PBP'leri için afinitesi yüksektir, bu nedenle porin geçirgenliği ve dışa atım pompalarındaki değişikliklerden etkilenme oranı düşüktür.

Ambler sınıf C β -laktamazlarda aşırı ekspresyon veya mutasyonlar CT direncinde büyük orana sahiptir (85, 88).

2.3.3. İmipenem/silastatin Relebaktam

İmipenem/silastatin relebaktam, *P. aeruginosa*'ya karşı yüksek aktivite gösteren bir karbapenem- β -laktamaz inhibitörü kombinasyonudur. Erişkin hastalarda KÜSE, VİP ve KİAE tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Relebaktam, Ambler A ve C sınıfı β -laktamazları inhibe eder, sınıf D β -laktamazlara etkisi değişkendir. MBL üreten *P. aeruginosa*'ya etkili değildir. OprD kaybı, AmpC β -laktamaz ve dışa atım pompa mekanizmalarının kombinasyonu imipenem/silastatin relebaktam direnci ile ilişkilidir (88). *P. aeruginosa* tedavisinde kullanılan BL/BLİ antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmaları Tablo 5'te açıklanmıştır.

Tablo 5. *P. aeruginosa* tedavisinde kullanılan yeni BL/BLİ antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmaları (85)

Antibiyotik	Direnç mekanizması
Seftazidim avibaktam	Sınıf B karbapenemazlar (metallobetalaktamazlar) Dışa atım pompalarının aşırı aktivasyonu Porin değişiklikleri KPC geninin aşırı ekspresyonu veya mutasyonları Penisilin bağlayıcı proteinlerde mutasyon (nadir)
Seftolozan tazobaktam	Sınıf A beta laktamazlar (bazı GSBL'ler ve KPC) Sınıf B karbapenemazlar (metallobetalaktamazlar) AmpC'nin aşırı üretimi (<i>P. aeruginosa</i> hariç) Sınıf D karbapenemazlar (OXA-48-like)
İmipenem/silastatin relebaktam	Sınıf B karbapenemazlar (metallobetalaktamazlar) Sınıf D karbapenemazlar (OXA-48-like) Spesifik sınıf A karbapenemazlar (Örneğin GES) KPC geninin aşırı ekspresyonu Porin değişiklikleri

2.3.4. Sefiderokol

Sefiderokol bir siderofor sefalosporindir (89). 2019 yılında FDA tarafından yetişkinlerde KÜSE endikasyonu için, 2020'de VİP endikasyonu için onaylanmıştır (90). Sefiderokol, difüzyonla porin kanallarından geçebilir. Katekol yan zinciri, siderofor görevi görerek ferrik demiri bağlar ve PiuA adı verilen demir taşıyıcısıyla taşınarak periplazmik boşlukta birikir. Sefiderokol periplazmik boşlukta demirden

ayrıldıktan sonra PBP3'e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder. GSBL'lere, serin tipi karbapenemazlara ve MBL'lere karşı güçlü aktivite gösterir (88, 91, 92).

2.3.5. Kolistin

Kolistin nispeten dar bir spektruma sahip olup, katyonik yapısı gram negatif bakterilerin hücre zarındaki kalsiyum ve magnezyumun yerini alarak anyonik LPS moleküllerine bağlanır. Bu durum hücre zarında geçirgenliği artırarak hücre ölümüne sebep olur. Kolistin, MDR *P. aeruginosa*'ya karşı öncelikli tedavi seçenekleri arasında olmakla birlikte böbreğe olan yan etkileri ve in vitro duyarlılık testlerinin güvenilirliğine ilişkin endişeler nedeniyle sınırlı düzeyde kullanılmaktadır. *P. aeruginosa*'da kolistin direnci, günümüzde en kritik tehditlerden biridir. Kolistin direnci kromozomal olarak, mcr-1 aracılığıyla plazmidik olarak ya da GSBL ve KPC üretimine bağlı olarak görülebilir (87, 93, 184).

2.4. Karbapenemaz Üretiminin Tayininde Kullanılan Fenotipik Yöntemler

Karbapenemazların fenotipik tanısında karbapenem hidrolizine bağlı testler (karbapenem inaktivasyon metodu, modifiye Hodge testi, kolorimetrik yöntemler, MALDI-TOF), inhibitör temelli testler (kombinasyon disk testi, çift disk sinerji testi, gradiyent test) ve immünokromatografik yöntemler kullanılabilir (94). Ayrıca karbapenemaz tarama yöntemi olarak kromojenik (CHROMagar-KPC, ChromID CARBA, Brilliance CREvb.) ve kromojenik olmayan besiyerleri de kullanılır (94, 95).

2.4.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM)

Karbapenem inaktivasyon metodunda (CIM) bir öze dolusu (10 µl) bakteri distile su ile süspanse edildikten sonra MEM diski ilave edilerek 35±2°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir. MEM duyarlı *E.coli* ATCC 25922 suşu, 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanıp Mueller Hinton agara (MHA) yayıldıktan sonra süspansiyondan çıkarılan MEM diski MHA üzerine yerleştirilir. Bir gecelik inkübasyondan sonra plak değerlendirilir. Karbapenemaz üretimi varlığında diskteki MEM hidrolize edildiği için standart suşun disk çevresine kadar yayılması beklenir. Basit ve ucuz bir fenotipik yöntem olmasına rağmen inkübasyon süresinin bir güne

kadar uzaması, alınan bakteri miktarı ve zon çaplarının standardize edilmemesi, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar alınması gibi dezavantajları mevcuttur (96-98).

2.4.2. Modifiye Hodge Testi (MHT)

Modifiye Hodge testinde (MHT) *E.coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922, 0,5 McFarland bulanıklığında MHA'a yayıldıktan sonra plağın ortasına MEM diski konulur. Değerlendirilecek suşlar disk çevresinden plak kenarına doğru çizgi şeklinde ekilir ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edilir. Test edilen suşun diske doğru büyürken oluşturduğu yonca yaprağı benzeri girinti, suşun karbapenemaz ürettiğini gösterir. GSBL ve AmpC üreten suşlarda yalancı pozitif sonuç alınması bu testin dezavantajıdır (96, 99, 100).

2.4.3. Kolorimetrik Testler

Kolorimetrik testlerin çalışma prensibi, izolatin karbapenemaz aktivitesi sonucu karbapenemin β -laktam halkasının hidrolizine dayanır. Bunun sonucunda pH düşerek pH indikatöründe (Carba NP için fenol kırmızısı, Blue-CARBA için bromtimol mavisi) renk değişimine yol açar. Bu testlerin avantajlarından biri hızlı sonuç alınmasıdır. Duyarlılığı ve özgüllüğü iyi olmakla birlikte OXA-48 varlığında düşük performans göstermektedir (94-96).

2.4.4. Matrix Assisted Laser Desorption İonization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS yönteminde mikrobiyal numune ile bir matriks solüsyonu karıştırılarak kristalize edilir ve çelik plakaya uygulanır. Bu plaka cihazda lazer ışınlarına maruz bırakılır ve ribozomal proteinleri çözerek proteinlerin iyonlaşmasına yol açar. İyonlar elektromanyetik bir alan kullanılarak uçuş tüpünde hızlandırılır ve zamana göre kütle ağırlıkları tespit edilir. Uçuş zamanı bir dedektör tarafından ölçülür. Oluşturulan kütle spektrumu veri tabanındaki referans spektrumlarla karşılaştırılır (115). MALDI-TOF MS yöntemi ile karbapenem ajanın bakteriyel protein ekstraktlarıyla 1-4 saat inkübasyonundan sonra karbapenemlerin ve bozunma ürünlerinin kütle pikleri saptanarak karbapenem hidrolizi ve karbapenemaz tipi belirlenebilir (96, 101, 102).

2.4.5. İnhibitör Temelli Testler (Gradyent Test, Kombinasyon Disk Testi, Çift Disk Sinerji Testi)

Gradyent test (E-test); özellikle MBL'leri tespit etmek için kullanılır. Bu yöntem; bir tarafında karbapenemin, diğer tarafında ise karbapenem ve karbapenemaz inhibitörü kombinasyonunun bulunduğu bir şerit ile yapılır. Üç veya daha fazla çift kat dilüsyonda MİK azalması durumunda MBL pozitif olarak yorumlanır (94). Kombinasyon disk testinde, karbapenem diskini ile karbapenem ve inhibitör kombinasyonunu içeren diskin oluşturduğu inhibisyonzon çapları arasındaki fark ölçülür (94, 101). Çift disk sinerji testinde ise karbapenem ve karbapenemaz inhibitörüyle kombine olan diskler, belli mesafelere yerleştirilerek karbapenem ve inhibitörü arasındaki sinerji gözlemlenir. Bu testlerin düşük maliyetli olmaları, uygulanmaları açısından avantaj sağlamaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları yüksek saptanmakla birlikte karbapenemaz tipinin belirlenememesi, ESBL ve AmpC üreten izolatlarda yanlış pozitif sonuç alınması ve değerlendirmenin zaman alması gibi dezavantajlarından dolayı ileri çalışmalara ihtiyaç olmaktadır (94, 101, 103). Karbapenemazlara inhibitör temelli yaklaşım Tablo 6'da açıklanmıştır.

Tablo 6. Karbapenemazlara inhibitör temelli yaklaşım (94)

	Meropenem ile sinerji				Temosilin direnci
	DPA, EDTA	PBA	DPA + PBA	Kloksasilin	
KPC	(-)	(+)	(-)	(-)	d
MBL	(+)	(-)	(-)	(-)	d
OXA-48	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
KPC + MBL	d	d	(+)	(-)	d
AmpC + porin kaybı	(-)	(+)	(-)	(+)	d
GSBL + porin kaybı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

DPA: Dipikolinik asit, EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit, PBA: Fenilboronik asit

(+): Sinerjizm var, (-): Sinerjizm yok, d: Değişken

2.4.6. İmmünokromatografik Yöntemler (Lateral Flow)

Lateral Flow adı da verilen immünokromatografik yöntemde karbapenemaz enzimlerine özgü epitopları yakalaması için boya ile işaretlenmiş (altın vb.) ve nitroselüloz membrana sabitlenmiş antikorlar kullanılır. Antijenlerin immobilize edilmiş

antikorlarla birlikte sürüklenip membrana sabitlenmiş antikorlar tarafından yakalanması ile görünür bantlar oluşur. OXA-48, KPC, IMP, VIM ve NDM karbapenemazların kolay ve hızlı tespiti için ticari olarak geliştirilmiş yöntemler mevcuttur. Basit uygulanması, 15 dakikada sonuç alınması, duyarlılık ve özgüllük oranlarının %95-100 arasında olması testin avantajlarından (99, 104).

2.5. Karbapenemaz Tayininde Kullanılan Genotipik Yöntemler

Moleküler teknikler karbapenemaz üreten bakterileri saptamada altın standart yöntemdir ve fenotipik yöntemlerden daha güvenilirdir. Bu teknikler, PCR tabanlı yöntemler, hibridizasyon temelli yöntemler ve tüm genom dizilemeyi (WGS) içerir (105, 106). PCR yönteminde bir veya birden fazla primer kullanılarak etken ya da direnç genlerinin tespiti yapılabilir. Real-time PCR yönteminde DNA çift sarmalın ayrılması, düşük sıcaklıkta primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması ve DNA polimeraz aktivitesinin olduğu üç aşama; bir termal döngüleyici cihazda gerçekleşir. Floresan boyanın bağlı olduğu DNA probları sayesinde hedef DNA'nın amplifikasyonu floresan sinyaldeki artış ile gerçek zamanlı olarak tespit edilebilir (95, 101, 107). Microarray, aynı anda çok sayıda genin saptanmasını sağlayan hibridizasyona dayalı bir tekniktir. Bakteri DNA'sı, lamlardaki tamamlayıcı prob çiftleri ile hibridize edilir ve daha sonra prob-hedef hibridizasyonunun görünmesi için taranır (105). WGS, yeni nesil dizileme teknolojisidir. Bu yöntemde kısa sürede tüm bakteri genomu analiz edilebilir. Epidemiyolojik araştırmalarda kullanılır ve en kapsamlı moleküler teknolojidir. Ancak pahalıdır ve özel ekipman gerektirir (105, 108).

Bir bakteri türündeki direnç mekanizmasını doğru bir şekilde ayırt etmek, epidemiyolojik süveyans ve yayılma potansiyeline sahip olan yüksek riskli klonların tanımlanması için gereklidir. Pulse-field jel elektroforezi (PFGE) ve çoklu lokus sekans tiplemesi (MLST), karbapenem dirençli izolatların moleküler epidemiyolojisini incelemede kullanılan yöntemlerdendir (101, 103). PFGE yönteminde belli bir bakteri hücre yoğunluğu oluşturulduktan sonra oluşan süspansiyon düşük erime ısıli agaroz ile karıştırılarak kalıplara dökülür. Kalıplardaki agaroz blokları bazı enzim ve deterjanlarla proteoliz işlemine tabi tutularak bakteriyel DNA izolasyonu yapılır. Elde edilen DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda DNA fragmanları oluşturulur. Enzimatik parçalanmanın ardından agaroz blokları kuyucuklara uygulanır ve belli

aralıklarla yönü değiştirilen elektriksel akıma maruz bırakılır. Etidyum bromür ile boyanan jelde 5-20 kadar farklı büyüklükteki (10-800 kb) DNA parçaları bant şeklinde görünür hale gelir. Oluşan bant profilleri bilgisayar yazılımı sayesinde değerlendirilir (13, 109, 110). MLST yönteminde ise, metabolik fonksiyonlarla ilgili olan ve yaklaşık 450-500 baz çiftinden oluşan housekeeping genlerinin fragmanları kullanılır. Housekeeping genlerindeki farklı diziler; farklı aleller olarak tanımlanmakta, bu aleller MLST veri tabanına aktarılarak alel ve dizi profilleri tanımlanmaktadır. MLST, karbapenemazlarla ilişkili epidemik klonların ortaya çıkışını belirlemede kullanılmaktadır (103, 111).

2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT); fenotipik (disk difüzyon, gradiyent test, SMD, otomatize sistemler), genotipik (PCR, microarray, WGS) ve MALDI-TOF gibi yöntemlerle tespit edilebilir. Moleküler yöntemlerin kısa sürede sonuç vermesine rağmen pahalı olması ve çoklu direnç mekanizması olan organizmalarda yalnızca hedef direnç genini saptaması dezavantajlarıdır (112).

2.6.1. Disk Difüzyon (Kirby Bauer) Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, antibiyotik emdirilmiş disklerin bakteri süspansiyonu ile inokule edilmiş MHA agar üzerine yerleştirilmesi sonucunda antibiyotiğin agar ortamından yayılması prensibine dayanır. $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyondan sonra inhibisyon bölgeleriyle zon çapları değerlendirilir. Düşük maliyetli olması, tekrarlanabilir olması ve özel bir ekipman gerektirmemesi bakımından avantajlıdır. Ancak minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenemez ve inkübasyon süresi uzundur (112, 113).

2.6.2. Gradiyent Test Yöntemi (E-test)

Gradiyent test, disk difüzyon ve dilüsyon metodlarının avantajlı özelliklerine sahip olan bir ADT'dir. Agar ortamında MİK belirlenmesine olanak tanıyan, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay olan bir yöntemdir. Disk difüzyon testine benzer şekilde inokülasyon yapıldıktan sonra belirli konsantrasyonlarda antibiyotik

emdirilmiş şeritler yerleştirilir ve inkübasyona bırakılır. MİK değeri, elips şeklindeki inhibisyon alanının alt kısmının şerit ile kesiştiği yer olarak belirlenir. Gradyent test, MİK değerlerinin SMD ile uyumlu gözlenmesinden dolayı uluslararası kılavuzlar tarafından önerilmektedir. Pahalı ve uzun sürede sonuç alınması bu testin dezavantajıdır (112, 114).

2.6.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD)

SMD yöntemi, 96 kuyucuk içeren steril tek kullanımlık polistiren mikrotitrasyon plak kullanılarak yapılır. Her kuyucuk 0,1 ya da 0,2 ml hacim içerir. Plaktaki kuyucuklara, antimikrobiyal ajanların çift kat dilüsyonları uygulandıktan sonra, nihai konsantrasyonu $1-5 \times 10^5$ koloni oluşturan birim (CFU) olan seyreltilmiş mikrobiyal süspansiyon eklenir. 35°C’de en az 16-24 saat inkübe edilen plaklarda MİK değerleri görsel olarak ya da fotometrik bir cihazla değerlendirilir. SMD yöntemi standardize edilmiş bir yöntem olup ADT için referans yöntemdir (112, 114, 115).

2.6.4. Otomatize Sistemler

Disk difüzyon, gradyent test ve SMD gibi yöntemlerin sonuç alınma sürelerinin uzunluğundan dolayı bakteri tanımlanması ve ADT için hızlı ve güvenilir otomatize cihazlar geliştirilmiştir. VITEK 2 (bioMérieux, Fransa), MicroScan Walkaway (Dade-Behring, ABD) ve Phoenix (BD Diagnostic Systems, ABD) gibi optik sistem kullanan otomatize cihazlar günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. VITEK 2 sistemi bakteri tanımlanması ve MİK değerlerini 18 saate kadar verebilen dilüsyon tabanlı bir ADT sistemidir (112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın İzni

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 06/04/2022 tarihli ve 2022-32 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada %5 koyun kanlı agar, Eosin Methylen Blue (EMB) agar, Brain Heart İnfüzyon (BHI) Broth, MHA ve Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) besiyerleri kullanılmıştır. Kanlı ve EMB agar için ticari olarak hazır ikili besiyeri (Beslab, Türkiye) kullanılmış olup diğer besiyerleri toz şekillerinden hazırlanmıştır.

3.2.1. Brain Heart İnfüzyon Broth

Firma önerileri doğrultusunda hassas terazide toz halinde bulunan BHI besiyerinden (Condalab, İspanya) 37 gram (gr) tartılıp 1000 mL distile suda homojen olarak çözdürülmüş ve toplam hacmin %15'i olacak şekilde gliserol eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilip yaklaşık 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra endorf tüplerine dağıtılmıştır. Besiyerleri kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Mueller Hinton Agar

Toz halinde bulunan MHA besiyerinden (Condalab, İspanya) firma önerileri doğrultusunda 38 gr tartılıp 1000 mL distile suda homojen şekilde çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edildikten sonra yaklaşık 45-50°C'ye kadar soğutulmuştur. Besiyerleri, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerilerine göre 9 santimetre (cm) çapındaki steril petri kaplarına yaklaşık 25 mL olacak şekilde ve 15 cm çapındaki steril

petri kaplarında yaklaşık 71 mL olacak şekilde, 4 ± 0.5 mm derinlikte dökülmüştür. Besiyerleri kullanılabilecek kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır. MHA besiyerleri, CIM ve disk difüzyon yönteminde kullanılmıştır (116).

3.2.3. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMBH)

Hazır toz halinde bulunan besiyerinden (BD, Amerika Birleşik Devletleri) 21 gr tartılıp 1000 mL distile suda homojen olarak çözündürülmüştür. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika boyunca steril edildikten sonra yaklaşık 45°C 'ye kadar soğutulmuştur. Besiyerleri kullanılacağı zamana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan İzolatların Tanımlanması Ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

Mart 2021-Ocak 2023 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteriyoloji bölümüne gönderilen klinik örneklerden (kan, idrar, yara, doku, balgam, derin trakeal aspirat, periton, plevra) izole edilen Vitek2 otomatize cihazındaki sonuca göre IPM veya MEM dirençli olan 103 adet *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların farklı örneklerinden aynı izolatın saptanması durumunda izolatlardan sadece biri çalışmaya dahil edilmiştir. Toplanan izolatlar %15 gliserol içeren BHI broth besiyerine alınıp -80°C 'de saklanmıştır. İzolatlar çalışılacağı zaman stoklanan suşlar oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlanmış ve kanlı agara tek koloni ekim tekniği ile pasajları yapıp 37°C 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

Üreyen koloniler; gram negatif boyanma özelliği, %5 koyun kanlı agarda hemoliz ve pigment oluşturma, EMB agarda laktoz negatif koloni morfolojisi, oksidaz pozitifliği ve karakteristik koku gibi konvansiyonel yöntemlerle değerlendirilmiş, bu özellikleri taşıyan izolatlar *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi için Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi, karbapenem direncinin belirlenmesi için Vitek 2 Compact otomatize sistemi ve Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi

kullanılmıştır. CZA duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyon ve SMD yöntemi kullanılmıştır.

3.4. Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması

Disk difüzyon yöntemi EUCAST önerilerine göre MEM 10 µg ve CZA 10/4 µg (Bioanalyse) diskleri ile yapılmıştır (116, 117). 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra, steril bir eküvyonla MHA plağına üç farklı yönde inoküle edilmiş ve antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 35±1°C’de 18±2 saat boyunca inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir.

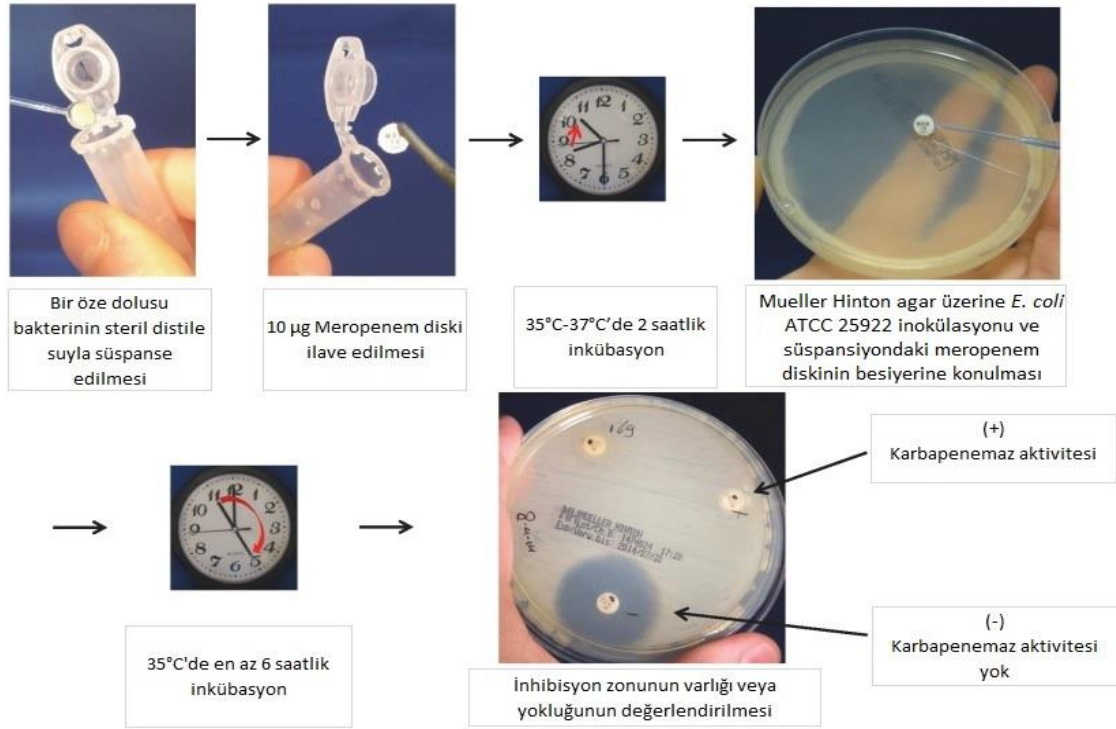
3.5. Vitek 2 Compact Otomatize Sistemi

İzolatlar %5 koyun kanlı agarda üredikten sonra tür düzeyinde tanımlama için GN kartı, antimikrobiyal duyarlılık için AST-325, AST-326, AST-420 ve AST-423 kartları üretici firma önerisi doğrultusunda kullanılmıştır. Duyarlılık testlerinin sonuçları EUCAST önerilerine göre değerlendirilmiştir.

3.6. Karbapenemaz Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması

Karbapenemaz üretiminin araştırılmasında fenotipik yöntem olarak CIM kullanılmıştır. Kalite kontrolü için karbapenemaz ürettiği bilinen pozitif kontrol suşları ile karbapenemaz üretmeyen *P. aeruginosa* ATCC 27853 (negatif kontrol suşu) kullanılmıştır. İzolatlar %5 koyun kanlı agarda saf olarak üretildikten sonra 10 mikrolitre (µl) bakteri alınarak 400 µl steril distile su ile bir endorf tüpü içerisinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyonun içerisine 10 µg’lık MEM diski ilave edilerek 2 saat 35±2°C’de inkübe edilmiştir. Karbapenem duyarlı standart bir suş olan *E. coli* ATCC 25922 kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanıp steril eküvyonla MHA üzerine inokülasyon yapılmıştır. 2 saat inkübasyondan sonra MEM diski alınarak, standart suşun inoküle edildiği MHA plağına yerleştirilmiştir. MEM diski yerleştirilen plaklar 35±2°C’de 6 saatlik ve bir gece inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. MEM diskinin standart suşu inhibe edememesi ve inhibisyon zonu görülmemesi, karbapenemaz üretimi lehine değerlendirilmiş ve pozitif sonuç olarak yorumlanmıştır. Belirgin bir inhibisyon zonunun görüldüğü izolatlar karbapenemaz

üretmeyen suş olarak değerlendirilmiş ve negatif sonuç olarak yorumlanmıştır (97). Referans izolatla kıyaslandığı zaman inhibisyon zonunun kısmi olarak dar gözlenmesi ise belirsiz sonuç olarak yorumlanmıştır. Karbapenem inaktivasyon metodunun uygulanışı Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4. Karbapenem inaktivasyon metodunun uygulanması (97)

3.7. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon çalışmasında Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) besiyeri (BD BBL Mueller-Hinton II Broth) ile Ceftazidime (MedChemExpress, USA) ve Avibactam sodium (MedChemExpress, USA) antibiyotiklerinin toz şekilleri kullanılmıştır. Besiyeri ve antibiyotik stok çözeltileri hazırlanırken üretici firmaların talimatları ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ın ve EUCAST'ın önerileri dikkate alınmıştır.

3.7.1. Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı

CTZ ve avibaktam için ayrı stok çözeltileri hazırlanmıştır. CTZ için 10240 µg/mL, avibaktam için 160 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi elde edilmiştir. CTZ için çözücü olarak tartılan antibiyotik miktarının %10'u kadar sodyum karbonat

(Na₂CO₃) ve distile su, sulandırıcı olarak distile su kullanılmıştır. Avibaktam için çözücü ve sulandırıcı olarak distile su kullanılmıştır. Stok çözeltileri, üretici firma talimatlarına göre hazırlanmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{İstenen konsantrasyon (C, } \mu\text{g/mL)}}{\text{Potens (} \mu\text{g/mg)}}$$

- 2 mL hacimde 10240 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda CTZ stoğu elde etmek için yukarıdaki formül uygulanarak; $2 \times 10240 / 996 = 20,63$ mg CTZ tozu hassas terazide tartılarak kullanılmıştır.
- İlk olarak 1 mL steril distile su ve 2 mg Na₂CO₃ karıştırılmış, daha sonra 20,63 mg CTZ toz antibiyotik eklenip kalan 1 mL distile su ilave edilmiştir. Homojen çözelti elde edilene kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir.
- Elde edilen 2 mL hacimdeki CTZ stok çözeltisinin 500 μL 'si çalışmada kullanılmış, kalan 1500 μL ise ependorf tüplerine ayrıştırılıp -20°C'de muhafaza edilmiştir.

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

- 5 mg avibaktam tozu kullanılarak 160 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda avibaktam stoğu elde etmek için yukarıdaki formül kullanılarak $5 \times 986 / 160 = 30,8$ mL steril distile su kullanılmıştır.
- Elde edilen 30,8 mL hacimdeki avibaktam stok çözeltisinin 5 mL'si çalışmada kullanılmış olup kalan kısmı ependorf tüplerine ayrıştırılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.2. Dilüsyon Basamakları

Hazırlanan CTZ stok solüsyonu, değişen miktarlarda KAMHB kullanılarak sulandırılmış ve farklı konsantrasyonlarda CTZ çözeltileri elde edilmiştir. Örneğin 10240 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki ana CTZ stoğundan 500 μL alınarak 9,5 mL KAMHB ile bir falkon tüpünde karıştırılmış, bu falkon tüpüne Falkon A ismi verilmiştir. Sonuç olarak Falkon A'da 1/20 dilüsyon sonucu 512 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde konsantrasyon elde

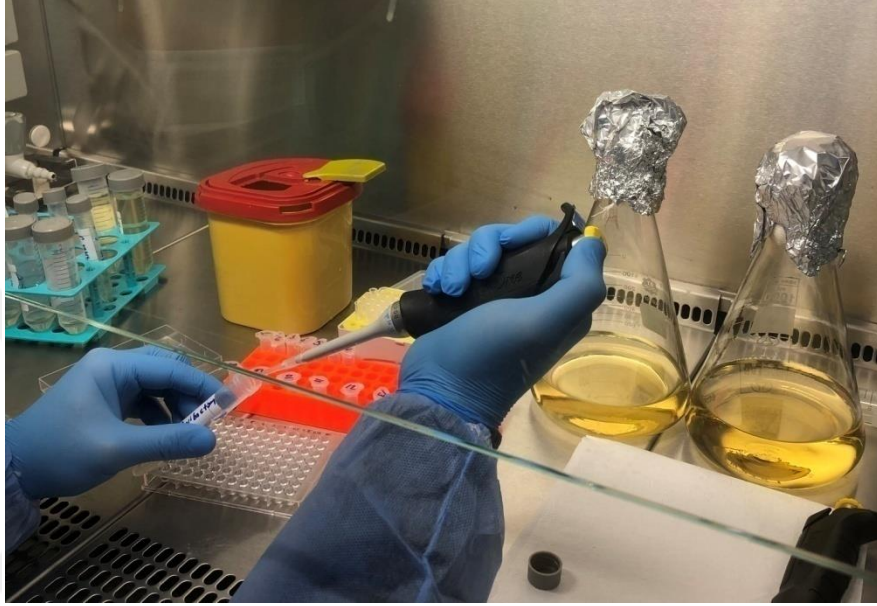
edilmiştir. Daha sonra Falcon A'daki çözeltiden 2,5 mL alınarak 2,5 mL KAMHB ile karıştırılıp Falcon B'de 256 µg/mL konsantrasyonda başka bir çözelti oluşturulmuştur. Bu örneklerle benzer şekilde A, B, C, D, E, F, G, H, I, J ve K adı verilen falkon tüplerinde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler elde edilmiştir. CTZ stok çözeltisinin mikropalak kuyucuklarına dağıtılma düzeni Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. CTZ stok çözeltisinin mikropalak kuyucuklarına dağıtılması

Kuyucuk	Konsantrasyon	Antibiyotik aktarılan yer	Eklenen antibiyotik miktarı	Eklenen KAMHB miktarı	Falkon tüpü	Oluşan konsantrasyon (µg/mL)	Mikropalak üzerindeki son konsantrasyon (µg/mL)
1	10240	İLAC STOĞU	500 µl	9,5 mL	A	512	128
2	512	A	2,5 mL	2,5 mL	B	256	64
3	512	A	2,5 mL	7,5 mL	C	128	32
4	128	C	2,5 mL	2,5 mL	D	64	16
5	128	C	1,25 mL	3,75 mL	E	32	8
6	128	C	1,25 mL	8,75 mL	F	16	4
7	16	F	2,5 mL	2,5 mL	G	8	2
8	16	F	1,25 mL	3,75 mL	H	4	1
9	16	F	1,25 mL	8,75 mL	I	2	0,5
10	2	I	2,5 mL	2,5 mL	J	1	0,25
11	2	I	1,25 mL	3,75 mL	K	0,5	0,125
Besiyeri kontrolü							

3.7.3. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanışı

Bakteri süspansiyonu oluşturmak amacıyla 0,5 McFarland bulanıklığında (10^8 cfu/mL) çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 10 µl alınarak 990 µl KAMHB ile sulandırılmıştır. 1/100 dilüe olan bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu 1×10^6 cfu/mL olmuştur.



Şekil 5. Sıvı mikrodilüsyon hazırlıkları

3.7.4. Mikroplak Uygulaması ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

- Mikrodilüsyon yöntemi için U tabanlı steril mikroplaklar kullanılmıştır.
- Bu uygulama sonrası mikroplakta CTZ konsantrasyonunun 128'den 0,125µg/mL'ye kadar seri dilüsyonları sağlanmış, avibaktamın konsantrasyonu 4 mg/L'de sabit tutulmuştur. Her bir bakteri süspansiyonu için son konsantrasyon 5×10^5 olmuştur.
- Önceden hazırlanmış antibiyotik stok solüsyonları -20°C 'den çıkarılıp oda ısısına getirildikten sonra dilüsyon basamağı kısmında hazırlanan falkon tüpleri içindeki CTZ solüsyonları, sütundaki kuyucuklara 25'er µl dağıtılmıştır. Örneğin; Falkon A'da 512 µg/mL konsantrasyondaki CTZ solüsyonu A1 kuyucuğundan A7 kuyucuğuna kadar 25'er µl dağıtılmış veya Falkon K'daki 0,5 µg/mL konsantrasyonundaki CTZ solüsyonu K1 kuyucuğundan K7 kuyucuğuna kadar 25'er µl konulmuştur.

- 160 µg/mL konsantrasyondaki avibaktam stok çözeltisinden 5 mL kullanılıp 45 mL distile su ile sulandırılarak 1/10 oranında dilüe edilmiş, 16 µg/mL konsantrasyonda 50 mL hacimde çözelti elde edilmiştir. Oluşan bu çözelti kullanılarak A1'den K7 de dahil olmak üzere tüm kuyucuklara 25 µl dağıtılmıştır.
- Antibiyotik solüsyonları dağıtıldıktan sonra 1×10^6 cfu/mL konsantrasyonda hazırlanmış olan bakteri süspansiyonları besiyeri ve üreme kontrolleri haricindeki kuyucuklara (A1-K7), 50'şer µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Son sütundaki kuyucukların besiyeri kontrolü olarak kullanılmasından dolayı bu kısma CTZ ve avibaktam solüsyonları konulmamış, 100 µl KAMHB konulmuştur. Son sıradaki kuyucukların üreme kontrolü olarak kullanılmasından dolayı bu kısımdaki kuyucuklara (A8-K8) 50 µl KAMHB konulup 1×10^6 cfu/mL konsantrasyondaki 50 µl hacimde bakteri süspansiyonu eklenmiştir.

CZA duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmesinde kullanılan mikropak düzeni Tablo 8'de açıklanmıştır.

Tablo 8. CZA duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmesinde kullanılan mikropak düzeni

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
2	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
3	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
5	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
6	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
7	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4	0,125/4	BK
8	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	BK

ÜK: Üreme kontrolü BK: Besiyeri kontrolü

- Mikroplaklardaki toplam hacim 100 µl'ye tamamlandığından, kuyucuklardaki CTZ konsantrasyonu her sütun için falkon tüpündeki konsantrasyonun dörtte birine düşmüş (örneğin Falkon A için 512→128), avibaktam konsantrasyonu da yine dörtte birine düşmüştür (16→4). Bakteri süspansiyonunun nihai konsantrasyonu ise 1 x 10⁶'dan 5 x 10⁵'e düşmüştür.
- Mikroplaklar 37°C'de 16-24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Pellet veya bulanıklık görülmesi üreme olarak kabul edilmiş, berrak gözüken ilk kuyucuktaki konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenmiştir (119).

MİK sonuçları değerlendirilirken EUCAST'in CZA için belirlediği zon çapı ve MİK sınır değerleri kullanılmıştır. CZA için 16-17 mm aralığındaki değerler teknik belirsizlik alanı (ATU) olarak belirlenmiştir.

EUCAST'in *P. aeruginosa* için belirlediği MEM ve CZA antibiyotiklerinin disk difüzyon zon çapı ve MİK sınır değerleri Tablo 9'da açıklanmıştır.

Tablo 9. EUCAST'in *P. aeruginosa* için belirlediği MEM ve CZA antibiyotiklerinin disk difüzyon zon çapları ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değerleri (117)

	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zon çapı (mm)	
	S	R	S	R
Meropenem	≤2	>8	≥ 20	<14
Seftazidim avibaktam	≤ 8	>8	≥17	<17

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, S: duyarlı, R: dirençli

3.8. Moleküler Yöntemle Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması

Çalışmaya alınan izolatlardan DNA izolasyonu yapılmış, sık görülen karbapenemaz genlerine özgü primerler sayesinde PCR yöntemi uygulanmıştır. Çoğaltılan DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüştür.

3.8.1. DNA İzolasyonu

İzolasyon çalışmasında EURx GeneMATRIX TISSUE & BACTERIAL DNA Purification kiti kullanılmıştır. Her bir izolat tek koloni ekim yöntemiyle kanlı agara ekildikten sonra 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

- İzolasyona başlamadan önce 30 µl Buffer T solüsyonu, spin kolumn içeren mikrosantrifüj tüplerindeki membranın ortasından aktarıldı ve oda sıcaklığında bekletildi.
- Kültürden alınan bir öze dolusu bakteri, 500 µl steril distile su içerisinde vortekslenerek çözdürüldükten sonra santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım atıldı.
- Kalan pellet üzerine 300 µl Lyse BG eklenip vortekslenerek süspanse edildi.
- Vortekslenen süspansiyona 50 µl Buffer BL pipetlenip bu karışıma daha sonra 2 µl RNAase A solüsyonu eklendi.
- Oluşan süspansiyon vortekslendikten sonra ısı bloğunda 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- Süspansiyona 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra 3 saniye vortekslenerek 56°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra 350 µl Sol T eklenip 3 saniye vortekslendi ve 56°C’de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışım 15 saniye vortekslendi.
- Süspansiyon 12000 xg’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alttaki pellet kısmı alınmaksızın üstteki süpernatant kısımdan 600 µl DNA bağlayan spin kolumn tüpü üzerine aktarıldı. Spin kolumn içeren mikrosantrifüj tüpleri 11000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolumn çıkarılarak altta kalan sıvı döküldü.
- 500 µl Wash TX1 eklenerek 11000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolumn çıkarılarak alttaki sıvı döküldü.
- 500 µl Wash TX2 eklenerek 11000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolumn çıkarılarak alttaki sıvı döküldü.
- Bu aşamadan sonra herhangi bir solüsyon konulmadan spin kolumn içeren tüpler 11000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvının tüpün dip kısmına süzülmesi sağlandı.
- Altta sıvı süzülen tüp atıldı, üstteki spin kolumn 1,5 ml hacim içeren yeni bir ependorf tüpüne konuldu. DNA’yı spin kolumn’dan ayırmak için daha önce ısı

bloğunda 80°C’de ısıtılan Elution Buffer solüsyonu, 100 µl olacak şekilde aktarıldı.

- 2 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra mevcut tüp 11000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan spin kolumn atıldı, alttaki ependorf tüpünün kapağı kapatılarak -20°C’de saklandı.

3.8.2. PCR Yöntemi ile DNA Amplifikasyonu

Karbapenem dirençli izolatlar için; *blaKPC*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaOXA-48* ve *blaGES* gen bölgeleri araştırılmıştır. İzolatlarda araştırılan genler için pozitif kontroller kullanılmıştır. Primerler liyofilize halde temin edilmiş olup (Metabion), 100 µM konsantrasyon elde etmek amacıyla distile su kullanılmıştır. Oluşturulan bu solüsyonlar tekrar 1/20 oranda sulandırılarak 5 µM konsantrasyonda primerler elde edilmiş ve çalışma yapılana kadar -20°C’de saklanmıştır. PCR işlemi, Eppendorf MasterCycler Nexus Thermal Cycler cihazında uygulanmış olup toplam hacim 25 µl olarak belirlenmiş, reaksiyon karışımına 1 µl bakteri DNA’sı konulmuştur. PCR ürünleri 0.2 mL lik ependorflar içerisinde yer almıştır. Birincisi *blaKPC*, *blaNDM* *blaOXA-48* ve *blaVIM* için, ikincisi *blaIMP* için, üçüncüsü de *blaGES* için olmak üzere üç farklı protokol kullanılmıştır. Kullanılan primer dizileri Tablo 10’da, kullanılan protokoller Tablo 11’de, PCR içeriği ise Tablo 12’de açıklanmıştır.

Tablo 10. Karbapenemaz üretiminden sorumlu *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48*, *blaIMP* ve *blaGES* gen bölgeleri için kullanılan primer dizileri

Primer adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Gen bölgesi	Kaynak
KPC-F KPC-R	TGTCAGTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	<i>blaKPC</i> (900 bp)	(120)
NDM-F NDM-R	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	<i>blaNDM</i> (782 bp)	
VIM-F VIM-R	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	<i>blaVIM</i> (389 bp)	
OXA-48-F OXA-48-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	<i>blaOXA-48</i> (438 bp)	
IMP-F IMP-R	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC GTACGTTTCAAGAGTGATGC	<i>blaIMP</i> (587 bp)	(121)
GES-F GES-R	ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	<i>blaGES</i> (864 bp)	(122)

Tablo 11. Karbapenemaz üretiminden sorumlu *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48*, *blaIMP* ve *blaGES* gen bölgelerinin amplifikasyon koşulları

<i>blaKPC</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaVIM</i> ve <i>blaOXA-48</i>	İlk denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	95°C	45 saniye	35 döngü
	Bağlanma	60°C	45 saniye	
	Uzama	72°C	1 dakika	
	Son uzama	72°C	8 dakika	1 döngü
<i>blaIMP</i>	İlk denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	95°C	1 dakika	35 döngü
	Bağlanma	55°C	1 dakika	
	Uzama	72°C	1 dakika	
	Son uzama	72°C	5 dakika	1 döngü
<i>blaGES</i>	İlk denatürasyon	94°C	5 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94°C	1 dakika	30 döngü
	Bağlanma	55°C	1 dakika	
	Uzama	72°C	1,5 dakika	
	Son uzama	72°C	10 dakika	1 döngü

Tablo 12. PCR karışımlarının içeriği

PCR bileşenleri	Her bir reaksiyondaki hacim	Konsantrasyon	Karışımdaki Final Konsantrasyon
10X Tampon	2,5 µl	10x	1x
MgCl ₂	1,5 µl	25 mM	1,5 mM
Primer-F	1 µl	5 µM	200 nM
Primer-R	1 µl	5 µM	200 nM
dNTP	1 µl	5 mM	200 µM
DNA polimeraz	0,25 µl	5 U/µl	0,05 U/µl
DNA	1 µl		
dH ₂ O	16,75 µl		
Toplam	25 µl		

3.8.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Saptanması

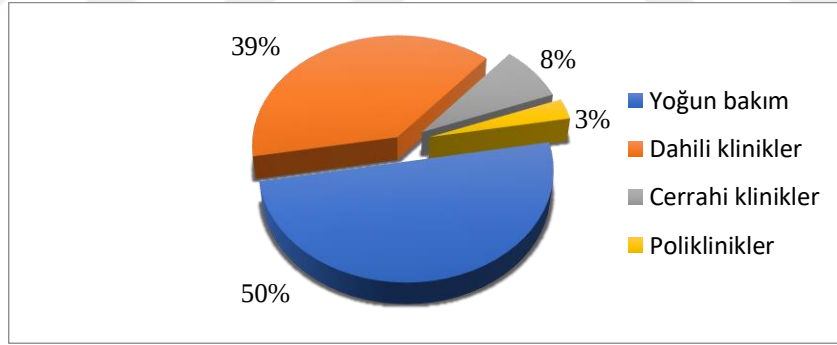
- Daha önce hazırlanan 50x TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) çözeltisinden (242 g TRİS, 57,1 mL glasiyal asetik asit ve 50 mL 0.5 M EDTA, pH 8, su ile 1 litreye tamamlandı) 20 ml alınarak 980 mL distile su ile karıştırılmış ve 1 litrelik 1x TAE tampon çözeltisi hazırlanmıştır.
- Hassas terazide 2,08 gr agaroz tartılıp 160 mL 1x TAE tampon çözeltisinde çözdürülerek konsantrasyonu % 1,3 olacak şekilde agaroz jel hazırlanmıştır.
- Tampon çözeltisi içerisindeki agaroz, mikrodalga fırında eritildikten sonra soğumaya bırakılmıştır. Jel sıcaklığı 45-50°C'ye geldiğinde 14 µl etidyum bromid solüsyonu eklenmiştir.
- Uygun taraklar elektroforez tankına yerleştirildikten sonra agaroz jel, yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde dökülmüş ve katılaşması sağlanmıştır.
- PCR ürünlerinden 10 µl alınarak loading buffer ile karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklenmiştir. İzolatlara ait DNA bantları “Hibridgen 100 bp DNA Ladder Plus” belirteci ile karşılaştırılmıştır.
- PCR ürünleri elektroforez tankında (Biorad) 140 voltta (V) 45 dakika yürütülmüş, elde edilen DNA bantları, transillüminatör görüntüleme cihazında (Major Science) UV ışık altında incelenmiştir.

3.9. İstatistik

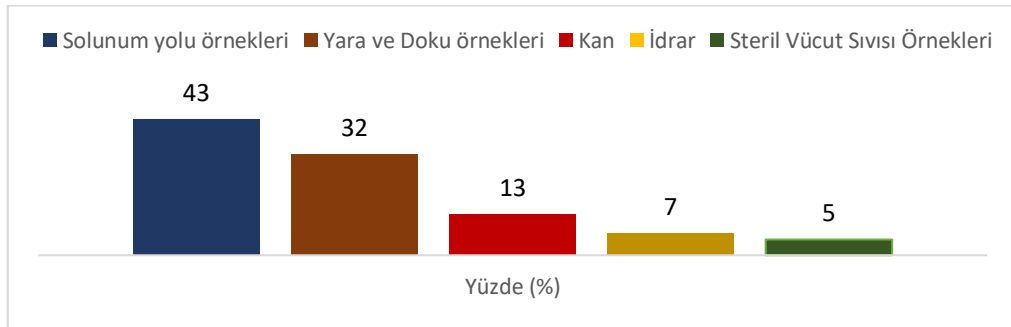
Verilerin değerlendirilmesinde istatistiksel analizler için IBM-SPSS (Statistical Package for Social Science-Version 22) programı kullanılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi kullanılmıştır. Anlamlılık $P < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. CLSI yönergelerine göre kategorik uyum, büyük hata ve çok büyük hata oranları belirlenmiştir. Kategorik uyum (KU); ölçülen testin referans teste göre duyarlı izolatu duyarlı ve dirençli izolatu dirençli saptayabilmesi olarak tanımlanmış ve $\geq 90\%$ olması anlamlı kabul edilmiştir. Büyük hata oranı (BH); referans yöntemle duyarlı bulunup ölçülen testte dirençli bulunan isolatlar için tanımlanmış olup $\leq 3\%$ olması anlamlı kabul edilmiştir. Çok büyük hata oranı (ÇBH); referans yöntemle dirençli bulunan izolatu ölçülen testte duyarlı bulunması olarak tanımlanmıştır ve $\leq 3\%$ olması anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteriyoloji bölümüne Mart 2021-Ocak 2023 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen ve karbapenemlere dirençli olan 103 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahiledilmiştir. Bu izolatların 64'ünü (% 62) erkek hastaların örnekleri, 39'unu (%38) kadın hastaların örnekleri oluşturmuştur. Çalışmada en çok izolat toplanan klinikler yoğun bakım servisleri olmuştur. İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarının 13'ünü (%13) kan, 42'sini (%41) derin trakeal aspirat (DTA), 2'sini (%2) balgam, 26'sını (%25) doku biyopsi örneği, 7'sini (%7) yara, 7'sini (%7) idrar, 5'ini periton (%4) ve 1'ini (%1) plevra örnekleri oluşturmuştur. Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarının kliniklere göre dağılım yüzdeleri Şekil 6'da, izolatların örnek türlerine göre dağılım yüzdeleri Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 6. CRPA izolatlarının kliniklere göre dağılım yüzdeleri

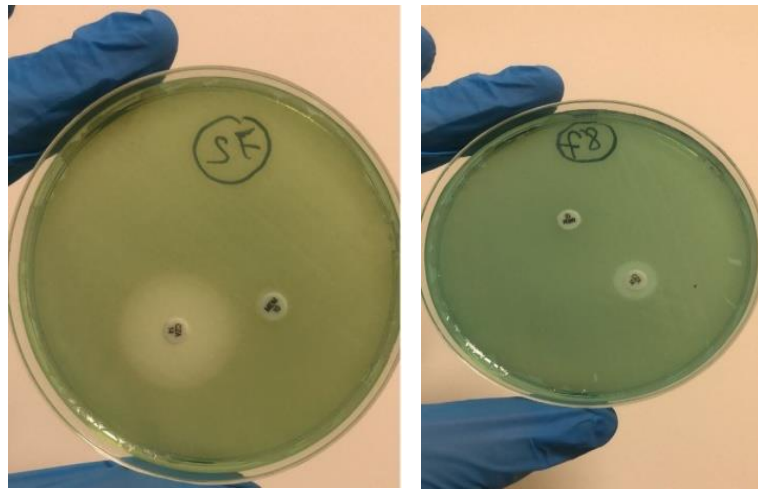


Şekil 7. CRPA izolatlarının örnek türlerine göre dağılım yüzdeleri

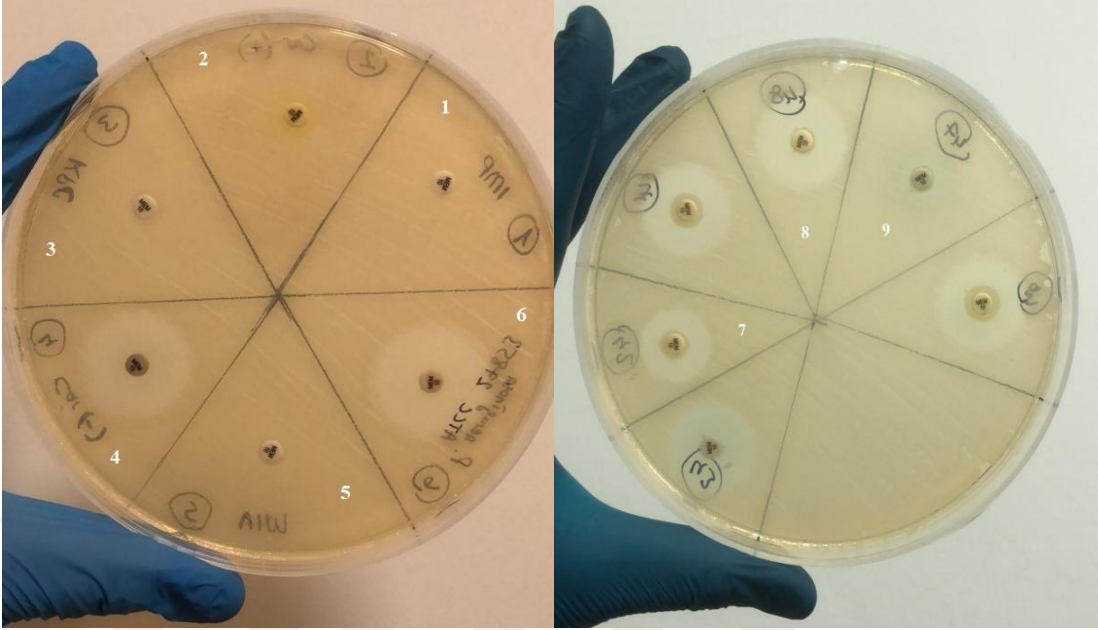
Çalışmaya dahil edilen 103 CRPA izolatının VITEK 2 sonuçlarına göre %96,1'i piperasilin tazobaktama, %76,7'si seftazidime, %79,6'sı sefepime, %80,6'sı siprofloksasine, %51,5'i ise amikasinine dirençli bulunmuştur.

İzolatların SMD sonuçlarına göre 71'i (%69) CZA'a duyarlı, 32'si (%31) CZA'a dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların 68'i (%66) CZA'ya duyarlı bulunmuş, 33'ü (%32) dirençli tespit edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi uygulanan izolatlardan 98'i SMD sonuçları ile uyumlu sonuç vermiş, ikisi teknik belirsizlik alanı içerisinde bulunmuş, üç izolatta yöntemler arası uyumsuzluk gözlenmiştir. Teknik belirsizlik alanı içinde bulunan izolatlar SMD ile duyarlı bulunmuştur. Üç uyumsuz izolatın ikisi disk difüzyon ile CZA'a dirençli olup SMD ile duyarlı bulunurken, bir izolat disk difüzyon ile CZA'a duyarlı ve SMD ile dirençli saptanmıştır. Kategorik uyum %95,1 olarak saptanmış, BH %5,7 ve ÇBH: %3 olarak bulunmuştur.

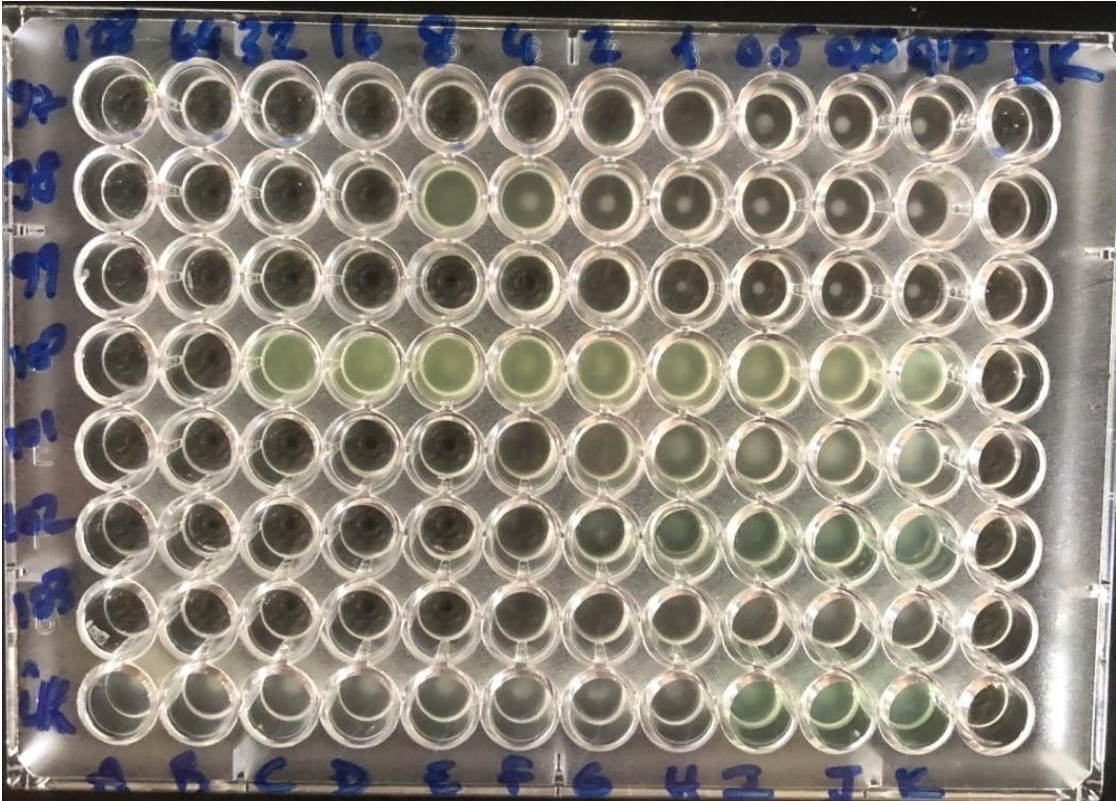
103 CRPA izolatı içerisinde PCR ile 2 NDM, 1 VIM ve 8 GES üreten izolat tespit edilmiştir. CIM ile fenotipik olarak karbapenemaz varlığı araştırılan izolatların 5'inde CIM pozitifliği saptanmıştır. NDM ve VIM üreten 3 izolatta CIM pozitifliği saptanmış; GES üreten izolatların 6'sında CIM sonucu belirsiz olarak tespit edilirken ikisinde CIM sonucu negatif bulunmuştur (Duyarlılık: %97,8, Özgüllük: %81,2, $P<0.001$). CZA ve MEM duyarlılığının disk difüzyonla belirlenmesi Şekil 8'de, pozitif ve negatif kontrol örnekleri ile pozitif, negatif ve belirsiz izolatların CIM sonuçları Şekil 9'da, CRPA suşlarında SMD ile MİK belirlenmesi Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 8. CRPA izolatlarında CZA ve MEM duyarlılığının disk difüzyonla belirlenmesi (sol: CZA duyarlı/MEM dirençli, sağ: CZA dirençli/MEM dirençli)



Şekil 9. CIM sonucu pozitif, negatif ve belirsiz olan izolatlar ile pozitif ve negatif kontrol örnekleri (1: IMP pozitif kontrol, 2,5 ve 9: CIM (+) izolat, 3: KPC pozitif kontrol, 4 ve 8: CIM (-) izolat, 6: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Negatif kontrol) 7: CIM sonucu belirsiz izolat)



Şekil 10. CRPA suşlarında SMD ile MİK belirlenmesi

İzolatların CZA disk difüzyon zon çapları ve yorumları, CZA MİK sonuçları ve yorumları, CIM sonuçları ve PCR sonuçları Tablo 13'te, agaroz jel elektroforezinde tespit edilen PCR amplifikasyon ürünleri Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. CRPA izolatlarının CZA disk difüzyon, CZA MİK, CIM ve PCR sonuçları

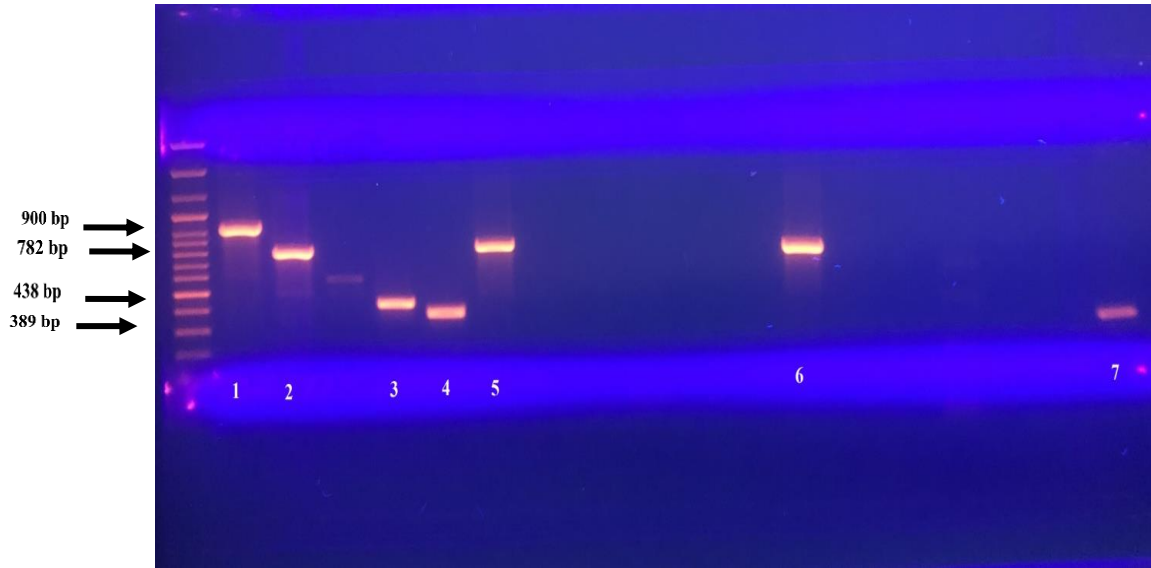
İzolat	Örnek	Cinsiyet	Yattığı servis	CZA zon çapı	CZA zon yorum	CZA MİK	CZA MİK yorum	CIM	PCR
CRPA-1	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-2	KAN	E	3. basamak yoğun bakım	12	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-3	KAN	K	3. basamak yoğun bakım	17	ATU	8	S	Negatif	(-)
CRPA-4	KAN	E	Diyabetik Ayak servisi	8	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-5	KAN	E	3. basamak yoğun bakım	11	R	8	S	Negatif	(-)
CRPA-6	KAN	K	Gastroenteroloji Servis	9	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-7	KAN	E	2. basamak yoğun bakım	8	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-8	KAN	E	Gastroenteroloji Servis	14	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-9	KAN	E	1. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-10	KAN	K	Genel Cerrahi Servis	15	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-11	KAN	K	Gastroenteroloji Servis	13	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-12	KAN	E	Genel Cerrahi Servis	9	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-13	PERİTON	E	Genel Cerrahi Servis	10	R	32	R	Negatif	(-)
CRPA-14	PERİTON	E	Genel Cerrahi Servis	23	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-15	PERİTON	K	Genel cerrahi servis	12	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-16	PERİTON	E	Nefroloji servisi	22	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-17	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	24	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-18	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	24	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-19	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	19	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-20	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	19	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-21	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	14	R	4	S	Negatif	(-)
CRPA-22	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	19	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-23	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	0	R	>128	R	Pozitif	NDM
CRPA-24	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	22	S	16	R	Negatif	(-)
CRPA-25	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	18	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-26	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	20	S	8	S	Negatif	(-)

CRPA-27	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-28	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-29	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	26	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-30	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-31	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	26	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-32	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	25	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-33	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	22	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-34	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-35	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	15	R	16	R	Belirsiz	GES
CRPA-36	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	12	R	16	R	Belirsiz	GES
CRPA-37	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	25	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-38	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	14	R	32	R	Belirsiz	GES
CRPA-39	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	13	R	64	R	Belirsiz	GES
CRPA-40	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	14	R	16	R	Negatif	GES
CRPA-41	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	12	R	16	R	Negatif	GES
CRPA-42	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	0	R	128	R	Belirsiz	GES
CRPA-43	PLEVRA	K	3. basamak yoğun bakım	11	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-44	DOKU	K	Diyabetik Ayak servisi	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-45	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	23	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-46	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	22	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-47	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	11	R	64	R	Pozitif	(-)
CRPA-48	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	24	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-49	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	25	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-50	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-51	KAN	K	1. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-52	DTA	E	2. basamak yoğun bakım	22	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-53	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	20	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-54	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-55	DTA	K	Göğüs Cerrahi servisi	19	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-56	BALGAM	E	Kalp Damar servisi	19	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-57	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	0	R	>128	R	Pozitif	NDM
CRPA-58	PERİTON	K	Genel Cerrahi Servis	12	R	16	R	Negatif	(-)

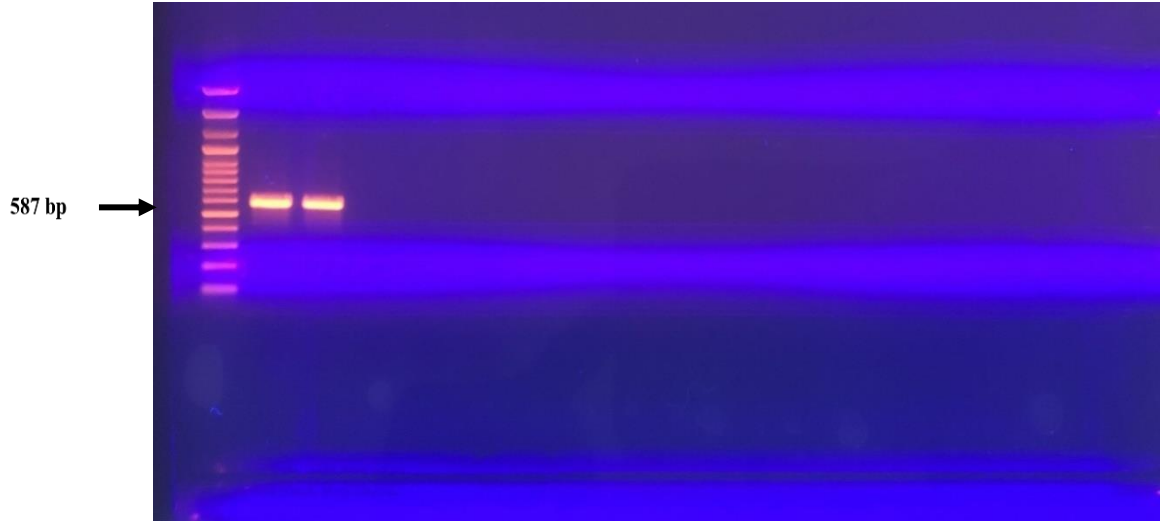
CRPA-59	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	19	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-60	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-61	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-62	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	18	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-63	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	19	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-64	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-65	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	27	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-66	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	11	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-67	KAN	K	2. basamak yoğun bakım	15	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-68	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	21	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-69	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	18	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-70	DTA	E	Diyabetik Ayak servisi	13	R	16	R	Pozitif	(-)
CRPA-71	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	26	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-72	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-73	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-74	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	13	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-75	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	19	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-76	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-77	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-78	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-79	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	20	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-80	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	0	R	64	R	Negatif	(-)
CRPA-81	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	19	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-82	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	21	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-83	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	24	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-84	BALGAM	E	Göğüs hastalıkları servisi	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-85	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	22	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-86	DOKU	E	Diyabetik Ayak servisi	13	R	16	R	Negatif	(-)
CRPA-87	İDRAR	K	3. basamak yoğun bakım	11	R	32	R	Negatif	(-)
CRPA-88	İDRAR	K	Palyatif servisi	21	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-89	İDRAR	E	Enfeksiyon servisi	25	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-90	İDRAR	K	Enfeksiyon polikliniği	23	S	4	S	Negatif	(-)

CRPA-91	İDRAR	E	Göğüs hastalıkları servisi	26	S	2	S	Negatif	(-)
CRPA-92	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-93	İDRAR	E	Göğüs hastalıkları servisi	20	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-94	YARA	K	3. basamak yoğun bakım	22	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-95	İDRAR	E	3. basamak yoğun bakım	19	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-96	YARA	K	Diyabetik Ayak servisi	25	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-97	YARA	E	Enfeksiyon servisi	16	ATU	8	S	Negatif	(-)
CRPA-98	YARA	K	Diyabetik Ayak servisi	14	R	16	R	Belirsiz	GES
CRPA-99	DTA	K	3. basamak yoğun bakım	18	S	4	S	Negatif	(-)
CRPA-100	YARA	E	Enfeksiyon polikliniği	0	R	64	R	Pozitif	VIM
CRPA-101	YARA	K	Palyatif servisi	18	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-102	DTA	E	3. basamak yoğun bakım	20	S	8	S	Negatif	(-)
CRPA-103	YARA	K	3. basamak yoğun bakım	23	S	4	S	Negatif	(-)

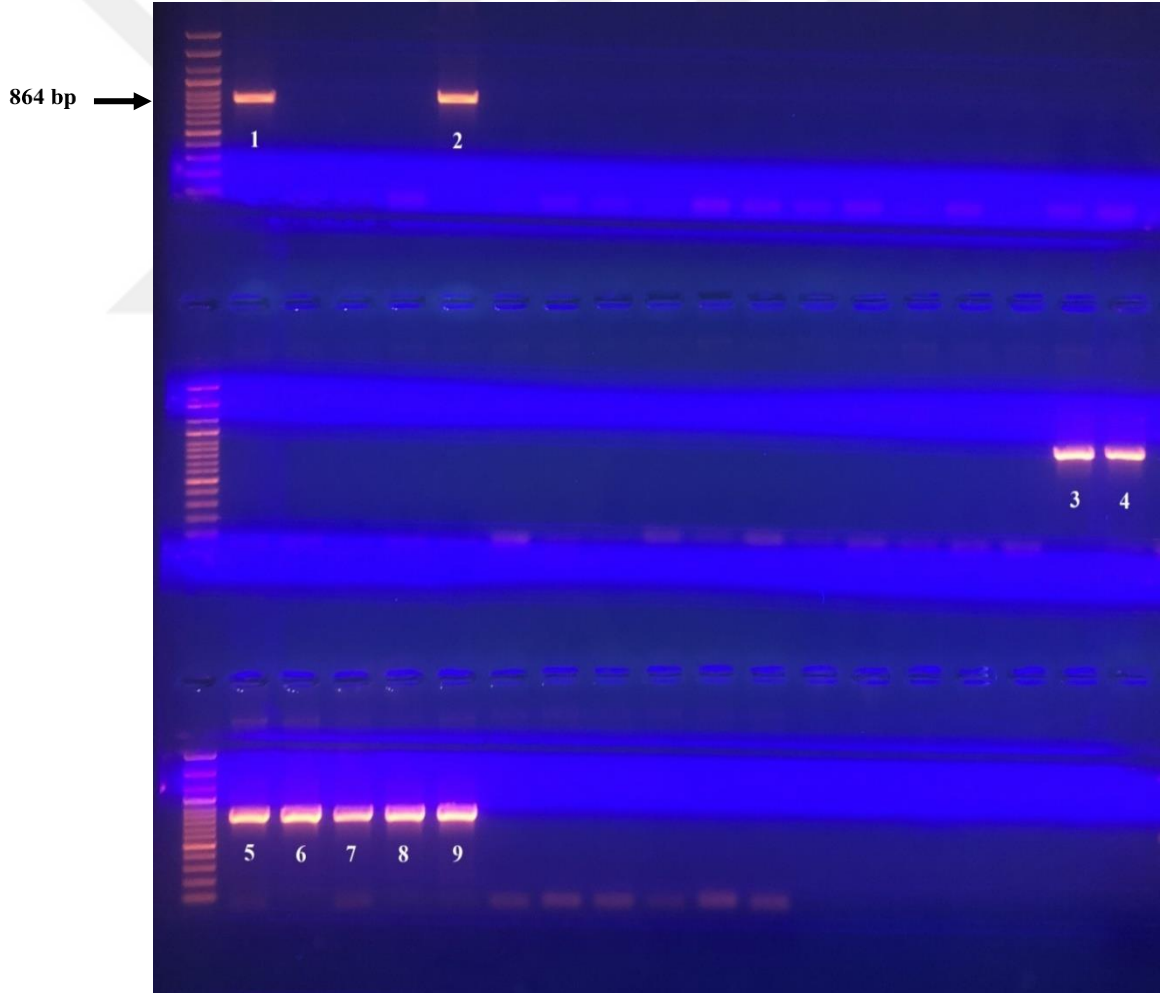
CZA: Seftazidim avibaktam, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, CIM: Karbapenem inaktivasyon metodu, S: Duyarlı, R: Dirençli, ATU: Teknik belirsizlik alanı, DTA: Derin trakeal aspirat



Şekil 11. *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48* ve *blaVIM* pozitif kontrolleri ile NDM ve VIM üreten izolatların PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (1: *blaKPC* pozitif kontrol suşu (900bp), 2: *blaNDM* pozitif kontrol suşu (782 bp), 3: *blaOXA-48* pozitif kontrol suşu (438 bp), 4: *blaVIM* pozitif kontrol suşu (389 bp), 5 ve 6: NDM pozitif izolatlar, 7: VIM pozitif izolat)



Şekil 12. *blaIMP* pozitif kontrollerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 13. *blaGES* pozitif kontrolü ile GES üreten izolatların PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (1: *blaGES* pozitif kontrol suşu (864 bp); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: GES pozitif izolatlar)

5.TARTIŞMA

Fırsatçı ve ÇİD bir patojen olan *P. aeruginosa*, hastane kaynaklı pnömoniler, VİP, idrar yolu enfeksiyonu, yanık yeri enfeksiyonu ve KDE gibi yüksek morbidite ve mortaliteye sahip enfeksiyonların önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. *P. aeruginosa*'nın inatçı doğası, dinamik antimikrobiyal direnç yolları ve sağlık hizmetleri üzerindeki önemli yükü nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü tarafından kritik öncelikli patojen olarak tanımlanmış ve yeni tedavi seçeneklerinin aciliyeti vurgulanmıştır (123).

Karbapenemler, antipsödomonal β -laktamlara dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar için tercih edilen bir ilaç grubudur. Son yıllarda *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç oranı hızla artmıştır, bu yüzden karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın (CRPA) yayılımı, dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç mekanizmaları; dış zar proteinlerinin kaybı, dışa atım pompalarının ve kromozomal AmpC'nin aşırı ekspresyonu, karbapenemaz genlerinin edinimi veya bunların birlikteliği gibi birçok faktöre bağlıdır. Edinilmiş karbapenemazların, özellikle MBL'lerin *P. aeruginosa*'da ortaya çıkması ve yayılması, karbapenemlerin etkinliği için tehdit oluşturmaktadır. Şimdiye kadar, *P. aeruginosa*'da sınıf A, B ve D karbapenemazlar tanımlanmıştır. Sınıf B MBL, *P. aeruginosa* tarafından sıklıkla üretilmektedir. Verona Integron-encoded MBL (VIM), imipenemase (IMP) ve New Delhi MBL (NDM); *P. aeruginosa*'da tanımlanmış olan en yaygın karbapenemaz grubu enzimlerdir (124, 125).

CRPA enfeksiyonu için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Polimiksinler ve aminoglikozidler CRPA tedavisinde kullanılmakla birlikte, artan direnç ve nefrotoksik etkileri nedeniyle alternatif tedavi yaklaşımlarının bulunması zorunlu olmuştur (126). CZA, üçüncü kuşak bir sefalosporin olan seftazidim ve non- β -laktam β -laktamaz inhibitörü avibaktamın bir kombinasyonudur. Avibaktam, Ambler sınıf A (genişletilmiş spektrumlu β -laktamazlar, KPC'ler), sınıf C (AmpC) ve bazı sınıf D (OXA-48) β -laktamazlara karşı güçlü in vitro aktiviteye sahiptir. Bu nedenle ÇİD *Enterobacterales* ve *P. aeruginosa* suşlarına etkilidir. Bu kombinasyonun önemli bir sınırlaması, MBL

üreten (NDM, VIM, IMP vb.) izolatları inhibe edememesidir (127). CZA; KİAE, KÜSE ve VİP tedavileri için onaylanmıştır (128). Ayrıca CZA; amikasin, kolistin, MEM ve aztreonam gibi antibiyotiklerle kombine edildiğinde ÇİD *P. aeruginosa*'ya karşı sinerjistik aktivite göstermektedir (129).

Rutin laboratuvarlarda CZA duyarlılığı için referans yöntem olan SMD'nin uygulanması zahmetli ve otomatize sistemlere benzer şekilde pahalıdır. CZA duyarlılığını güvenilir bir şekilde belirlemek için alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır (8). Bu çalışmada CRPA izolatlarında CZA duyarlılığını belirlemek için ekonomik ve kolay uygulanan bir yöntem olan disk difüzyon yöntemi ile altın standart yöntem olan SMD yöntemi EUCAST ve CLSI kılavuzları referans alınarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca karbapenemaz varlığını araştırmak için fenotipik olarak karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) kullanılmış ve genotipik olarak PCR yöntemiyle sık görülen karbapenemaz genleri (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48, GES) araştırılmıştır.

Çalışmaya 103 CRPA izolatı dahil edilmiş olup, bu izolatlar en sık yoğun bakım ünitelerinden (%50) izole edilmiştir. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* suşları en sık solunum yolu örnekleri ve yara örneklerinden izole edilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde CRPA izolatları en sık yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiş olup solunum yolu örneklerinden izolasyon sık görülmüştür (130-134). Çalışmamızdaki izolatların CZA haricindeki direnç oranları piperasilin tazobaktam için %96,1, seftazidim için %76,7, sefepim için %79,6, amikasin için %51,5 ve siprofloksasin için %80,6 olarak bulunmuştur.

Ülkemizde *P. aeruginosa*'da CZA duyarlılığını değerlendirmek için yapılan çalışmalar sınırlıdır. Aydemir ve ark. (131) tarafından yapılan çalışmada ÇİD 32 *P. aeruginosa* izolatının CZA duyarlılığı E-test ile değerlendirilmiş, izolatların %78,2'sinde CZA duyarlılığı tespit edilmiştir. Çetinkol ve ark. (132), 24 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının CZA duyarlılığını disk difüzyon ve E-test yöntemiyle değerlendirmişler ve bu iki yöntem için tüm izolatların sonuçları uyumlu bulunmuştur. İzolatların 20'sinde (%83,3) CZA'a duyarlılık tespit edilmiş olup, CZA'dan sonra en yüksek duyarlılık gösteren antimikrobiyal ajan %33 ile amikasin olmuştur. Mirza ve ark. (133), MEM dirençli 102 *P. aeruginosa* izolatının CZA duyarlılığını E-test ile değerlendirmişlerdir. İzolatların 85'inde (%83,3) CZA'a duyarlılık tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda 103 CRPA izolatının 68'i disk difüzyonla CZA'ya duyarlı bulunmuş ve bu çalışmalara kıyasla direnç oranı yüksek saptanmıştır.

Hoşbul ve ark. (134) tarafından yapılan çalışmada 100 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatının CZA duyarlılığı SMD ile değerlendirilmiş, bu izolatların %90'ı CZA'a duyarlı bulunmuştur. Zalas-Więcek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 98 CRPA izolatında CZA duyarlılığı SMD ile araştırılmıştır. CZA'a duyarlı izolatların oranı %54,8 bulunurken yeni nesil BL/BLI haricinde en fazla duyarlılık saptanan antimikrobiyal ajan %52 ile amikasin olmuştur (135). Tayvan'da yapılan bir süveyans çalışmasında 34 IPM dirençli *P. aeruginosa* izolatında SMD yöntemi ile %79,2 oranında CZA duyarlılığı tespit edilmiş, CZA ve kolistinden sonra en fazla duyarlılık amikasinde (%97,1) gözlenmiştir (136). Almanya'da yapılan çok merkezli bir çalışmada 448 MEM dirençli *P. aeruginosa* izolatının 213'ü (%47,5) SMD yöntemi ile CZA'a duyarlı tespit edilmiştir (137). Latin Amerika ülkelerini kapsayan bir süveyans çalışmasında 835 MEM dirençli *P. aeruginosa* izolatının %61,9'u SMD yöntemi ile CZA'a duyarlı bulunmuştur (138). Amerika'da yapılan çok merkezli bir çalışmada ise 290 MEM dirençli *P. aeruginosa* izolatının %81'i CZA'a duyarlı bulunmuştur (139). Çalışmamızda 103 CRPA izolatında CZA duyarlılığı referans yöntem olan SMD ile değerlendirilmiş; izolatların 71'i (%69) duyarlı, 32'si (%31) dirençli olarak tespit edilmiştir. CZA'dan sonra en yüksek duyarlılık oranı %48,5 ile amikasinde gözlenmiş ve bu çalışmalarla benzerlik göstermiştir.

CZA duyarlılığı için SMD ile disk difüzyon yöntemi karşılaştırıldığında, çalışmamıza dahil edilen 103 CRPA izolatının 98'inde disk difüzyon ve SMD sonuçları uyumlu gözlenmiştir. İki izolat disk difüzyon yöntemi ile teknik belirsizlik alanı içerisinde tespit edilirken bu izolatlar SMD ile duyarlı bulunmuştur. İki izolat disk difüzyon yöntemi ile dirençli görülmesine rağmen SMD ile duyarlı tespit edilmiş olup bu durum büyük hata (BH) olarak değerlendirilmiştir. Bir izolat disk difüzyon yöntemi ile duyarlı bulunmasına rağmen SMD sonucu dirençli tespit edilmiş ve bu durum çok büyük hata (ÇBH) olarak değerlendirilmiştir. Zhang ve ark. (2) tarafından yapılan bir çift merkezli çalışmada 74 *P. aeruginosa* izolatının CZA duyarlılığı, SMD ve disk difüzyon (30/20 µg) ile belirlenmiştir. Bu izolatların 60'ı (%86) SMD ile CZA'a duyarlı tespit edilmiş, disk difüzyon ile SMD kıyaslandığında kategorik uyum %95,95 olarak tespit edilmiş, 3 izolatta (%21,4) ÇBH bulunmuş, BH bulunmamıştır. Wang ve ark. (8)

tarafından yapılan bir çalışmada 74 *P. aeruginosa* izolatında disk difüzyon ve SMD yöntemleri karşılaştırılmıştır. Kategorik uyum %93,5 saptanmış, 4 izolatta BH saptanmış (%7,1), bir izolatta ise ÇBH saptanmıştır (%4,8). Çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde kategorik uyum %95,1 bulunmuş, BH oranı %5,7 ve ÇBH oranı %3 ile yüksek saptanmıştır.

Han ve ark. (140) tarafından yapılan bir çalışmada 182 *P. aeruginosa* izolatında SMD ve disk difüzyon (30/20 µg ve 10/4 µg) yöntemleri kıyaslanmıştır. SMD ile CZA'a %78 oranında duyarlılık saptanmış olup, 30/20 µg diskler için kategorik uyum %91,8 olarak tespit edilmiş, BH %9,9 ve ÇBH %2,5 olarak bulunmuştur. 10/4 µg diskler için kategorik uyum %87,9 olarak tespit edilmiş, BH %15,5 bulunmuş, ÇBH tespit edilmemiştir. Disk difüzyon yöntemi ile (10/4 µg) teknik belirsizlik alanı içerisinde bulunan (16-17 mm) 16 izolatın tamamı SMD ile CZA'a duyarlı bulunmuştur. Daragon ve ark. (141) tarafından yapılan bir çalışmada 200 *P. aeruginosa* izolatında CZA duyarlılığı disk difüzyon (10/4 µg), E-test, Vitek2 sistemi ve SMD olmak üzere dört farklı in vitro yöntem ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı marka için disk difüzyon yönteminin kategorik uyumu %85,5 olarak bulunmuş, BH oranı %16,9 olarak tespit edilmiştir. Schaumburg ve ark. (142) tarafından yapılan çalışmada 192 *P. aeruginosa* izolatının SMD ile CZA duyarlılığı %64,1 bulunmuş, ayrıca SMD ile iki farklı markanın disk yöntemi karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kategorik uyum %79,7 ve %88 bulunmuş, BH oranları %30,9 ve %17,9 olarak tespit edilmiş ve ÇBH oranı %1,4 bulunmuştur. Bu çalışmalar ile disk difüzyon testi için kabul edilebilir kategorik uyum değerleri değişkenlik göstermiştir. BH oranlarının fazla olması nedeniyle, disk difüzyon yönteminin duyarlı izolatlarda başarılı olduğu, ancak dirençli izolatlarda mutlaka alternatif bir doğrulama yöntemine başvurulması gerektiği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde yüksek BH oranı bulunmuş, ancak kategorik uyum sonucu bu çalışmalardan farklı olarak yüksek saptanmıştır.

Birçok antibiyotik intrinsik veya kazanılmış dirençten dolayı *P. aeruginosa*'ya etkili değildir. Özellikle karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa*'nın ortaya çıkışı küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Karbapenem direnci gelişiminde birçok mekanizma rol oynamaktadır. OprD porin proteininde kayıp veya azalma, karbapenem direncinde en sık görülen mekanizmadır ve çoğunlukla IPM'e karşı azalmış duyarlılıkla ilişkilidir.

MexAB-OprM gibi dışa atım pompalarının aşırı aktivasyonu MEM direnciyle ilişkilidir. Porin kaybı, dışa atım pompalarının aktivasyonu ve indüklenebilir AmpC sefalosporinazların aşırı üretimi gibi mekanizmaların kombinasyonu ile IPM MİK değeri 256 µg/mL ve MEM MİK değeri 128 µg/mL düzeylerine çıkabilir. Bunun dışında karbapenemaz genlerinin edinilmesiyle de karbapenemlere direnç gelişebilir. Yirmi yılı aşkın bir süre önce *P. aeruginosa*'da plazmid kodlu, aktarılabılır IMP tipi MBL'in ilk kez tanımlanmasıyla birlikte, *P. aeruginosa* için Ambler sınıf A, B ve D'ye ait çok sayıda karbapenemaz tanımlanmıştır (4, 143).

GES ve KPC, esas olarak GSBL olarak tanımlanan bir sınıf A serin β -laktamazdır. Birçok alt tipi tanımlanmasıyla birlikte GES-2 ve GES-5 varyantlarının karbapenem hidrolizinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (144). Enzimin karbapenemaz aktivitesi çok düşüktür (58). Bu yüzden GES, rutin fenotipik yöntemlerle saptanamaz ve tanımlanması için moleküler metodlar gereklidir (145). Güney Afrika Cumhuriyeti'nde 2000 yılında GES-2 üreten *P. aeruginosa* ve Kore'de 2004 yılında GES-5 üreten *P. aeruginosa*'nın neden olduğu salgınlar gözlenmiştir. GES-5 üreten *P. aeruginosa* dünya çapında Kore, Çin, Hindistan, Fransa, İspanya, Meksika ve Brezilya'dan rapor edilmiştir (57, 58). KPC üreten *P. aeruginosa* ilk kez 2007'de Kolombiya'dan bildirilmiş olup son yıllarda Brezilya, Çin ve Almanya'dan KPC-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları, Porto Riko'dan da KPC-5 üreten *P. aeruginosa* izolatı bildirilmiştir (66, 143, 146). Avrupa ülkelerinde, Rusya'da, Tayland ve Çin'de KPC ve GES üreten *P. aeruginosa* izolatları yüksek riskli klonlar olan ST235, ST111, ST357 ve ST463'te tanımlanmıştır.

P. aeruginosa'da Sınıf D karbapenemazlar dünya çapında yaygın değildir. Sıklıkla *A. baumannii*'de bulunan OXA-23, OXA-40, OXA-48 ve OXA-58 *P. aeruginosa*'da da nadiren görülmüştür (4, 147). OXA-48, Hindistan'da *E. coli* ve *P. aeruginosa* koenfeksiyonu mevcut olan bir vakadan bildirilmiştir. Plazmid üzerinde taşıyan bir sınıf 1 integron üzerinde tanımlanan OXA-198 Belçika'dan, OXA-181 ise Birleşik Krallık'tan bildirilmiştir (4, 148). Ülkemizden ilk OXA tipi karbapenemazların bildirimi Esenkaya ve ark. (149) tarafından yapılmış, bu çalışmada 184 CRPA izolatının 12'sinde OXA-23, 1'inde OXA-40 ve 1'inde OXA-58 tespit edilmiştir.

Sınıf B MBL enzimleri, *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen en yaygın karbapenemaz türüdür. Bunlar arasında VIM en yaygın olanıdır, ardından IMP ve NDM

gelir. *P. aeruginosa* 'nın bölgesel yayılımları sonucu AIM, GIM ve SPM bildirimleri de olmuştur (4, 163, 166).

VIM-1 üreten *P. aeruginosa*, ilk kez 1997'de İtalya'nın Verona bölgesinde Lauretti tarafından kromozomal yerleşimli olarak izole edilmiştir. Daha sonra alt tip olan VIM-2, Poirel tarafından sınıf 1 integron yerleşimli olarak tespit edilmiştir. VIM-2, dünya genelinde baskın olan subtipdir, VIM-1'e kıyasla IPM ve MEM'i 10 kat fazla hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir. Şu ana kadar 66'dan fazla VIM varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantların çoğu VIM-2 nin nokta mutasyonları veya aminoasit farklılıklarından kaynaklanmaktadır. VIM-2'nin üretimi özellikle Avrupa ülkelerinde ST111 riskli klonunda sık olarak görülmektedir. IMP, ilk olarak Watanabe ve ark. tarafından 1988 yılında Japonya'da bir plazmiddeki sınıf 1 integron üzerinde bulunmuştur. IMP, VIM'den sonra Avrupa'da en sık ikinci görülen MBL tipidir. IMP'nin 79'dan fazla varyantı vardır, bunların içinde yaygın görülen subtipi IMP-1'dir, ancak Asya ülkelerinde IMP-6 ve IMP-9 ön plana çıkmaktadır. IMP-6, diğer subtiplere göre MEM'i IPM'den daha iyi hidrolize edebilmektedir. Yüksek riskli klonlardan ST357 sıklıkla IMP üretmektedir.

NDM, ilk olarak Hindistan'a seyahat hikayesi bulunan bir hastada *K. pneumoniae* izolatından tanımlanmıştır. NDM üreten *P. aeruginosa* ise, ilk kez Jovic ve ark. tarafından 2013'te Sırbistan'da tanımlanmış ve bu izolatın ST235 yüksek riskli klonuna ait olduğu ortaya çıkmıştır. NDM'nin 27'den fazla varyantı bulunmaktadır, bunlardan en sık görülen alt tip NDM-1'dir. Dünya çapında yaygın olan NDM üreticisi ST235 klonuna ek olarak 2021 yılında NDM-1 üreten ST308 klonu tanımlanmış ve dünya çapında küresel bir risk haline gelmiştir. VIM, NDM ve IMP kıtalararası yayılıma neden olsa da bazı MBL'ler, bölgesel yayılımla sınırlı kalmıştır. SPM, AIM, GIM ve SIM gibi sınıf B MBL'ler daha az sıklıkla gözlenmektedir (4, 66, 143).

P. aeruginosa izolatlarında karbapenemaz üretimini saptamak *Enterobacterales* üyelerine göre zordur. Karbapenemaz üretimini saptamak için birçok fenotipik yöntem mevcuttur. CIM ve mCIM, karbapenemaz saptanması için basit ve düşük maliyetli olan yöntemlerdir. Nonfermenter gram negatif bakteriler için CIM ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz üretimi için altın standart yöntem moleküler metodlardır (150). Çalışmamızda 103 CRPA izolatının 5'inde CIM pozitifliği tespit edilmiştir. PCR yöntemi ile, CIM sonucu pozitif tespit edilen 5 izolatın

ikisinde NDM geni, birinde VIM geni tespit edilmiştir. CIM sonucu pozitif olan iki izolatta ise karbapenemaz geni saptanamamıştır. CRPA izolatları için CIM sensivitesi %97,8, spesifitesi %81,2 bulunmuştur. Çalışmamızda *P. aeruginosa*'da sık görülen karbapenemazlar araştırılmış, yaygın görülmeyen GIM, SIM, AIM, SPM gibi MBL genleri ile OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-181, OXA-198 gibi D sınıfı karbapenemaz genleri araştırılmamıştır. Bu yüzden CIM pozitif olup karbapenemaz geni saptanamayan izolatların, araştırdığımız genlerin dışında bir karbapenemaz geni bulundurduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda bulunan verilere benzer şekilde Gutiérrez ve ark. (150) tarafından yapılan bir çalışmada karbapenem dirençli ancak karbapenemaz (NDM, VIM, IMP ve KPC) üretmeyen 95 *P. aeruginosa* izolatının 4'ünde CIM pozitifliği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda PCR ile GES üretimi saptanan 8 izolatın 6'sında CIM sonucu belirsiz olarak yorumlanmış, ikisinde CIM sonucu negatif bulunmuştur. Bu çalışmalara benzer şekilde Gill ve ark. (151) tarafından yapılan bir çalışmada 126 *P. aeruginosa* izolatının 57'sinde GES karbapenemaz tespit edilmiş, bu izolatların 15'inde modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) negatif tespit edilmiştir. Lisboa ve ark. (152) tarafından yapılan bir çalışmada karbapenemaz ürettiği bilinen 31 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilmiş ve mCIM performansı değerlendirilmiştir. İzolatlardan 2'sinde mCIM sonucu pozitif çıkmasına rağmen karbapenemaz geni tespit edilememiştir. İzolatların 4'ünde mCIM sonucu negatif bulunmuş, bu izolatlardan 2'sinde GES-5, birinde NDM ve birinde VIM tespit edilmiştir. Ferjani ve ark. (153) tarafından yapılan bir çalışmada GES ürettiği bilinen 15 izolatın 10'unda mCIM sonucu negatif bulunmuştur. Gill ve ark. (154) yaptığı başka bir çalışmada 12 GES üreten *P. aeruginosa* izolatının 6'sı mCIM pozitif bulunurken 6'sı mCIM negatif bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada GES üreten izolatların inokulum miktarı ve inkübasyon süreleri artırıldıktan sonra mCIM sonuçlarında pozitifleşme görülmüştür. Bu çalışmalar, mCIM veya CIM pozitifliği saptanamamasının nedenini GES karbapenemazların düşük katalitik aktiviteye sahip olması ve bu nedenle karbapenem hidrolizinin tam gerçekleşmemesi olarak açıklamaktadır.

Song ve ark. (155) tarafından yapılan bir çalışmada 20 IMP-6 üreten ve 11 VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatının tamamında CIM pozitif saptanmıştır. Zwaluw ve ark. (97) tarafından yapılan başka bir çalışmada bir IMP üreten ve üç VIM üreten *P.*

aeruginosa izolatında CIM pozitifliği saptanmıştır. Akhi ve ark. (98) tarafından yapılan çalışmada 29 IMP üreten *P. aeruginosa* izolatının 28'inde ve 6 VIM üreten *P. aeruginosa* izolatının tamamında CIM sonucu pozitif bulunmuştur. Gill ve ark. (154) yaptığı çalışmada 96 karbapenemaz ürettiği bilinen (KPC, GES, VIM, NDM, IMP, SPM) *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. NDM üreten 13 izolatın 12'sinde mCIM sonucu pozitif saptanırken VIM, IMP, SPM ve KPC üreten suşların tamamında mCIM sonucu pozitif saptanmıştır. Çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde PCR ile VIM ürettiği saptanan bir izolatta ve NDM ürettiği saptanan iki izolatın tamamında CIM sonucu pozitif bulunmuştur.

CRPA izolatlarında karbapenemaz genlerinin araştırılması ile ilgili ülkemizde ve dünyada pek çok çalışma mevcuttur. Ülkemizde Malkoçoğlu ve ark. (156) 84 CRPA izolatında KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48 ve GES genlerini PCR yöntemiyle araştırmıştır. Bu çalışmada üç izolatta CIM ile karbapenemaz üretimi saptanmış ve PCR ile 2 VIM ve 1 GES izolatı tespit edilmiştir. Bu suşların ileri sekans incelemesinde ise izolatlarda sırasıyla VIM-1, VIM-2 ve GES-5 tespit edilmiştir. Vural ve ark. (157) tarafından yapılan çalışmada 58 CRPA izolatında IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, GIM-1 ve SPM genleri PCR ile araştırılmış, bu izolatların 6'sında VIM-1 ve birinde GIM-1 üretimi saptanmıştır. Çekin ve ark. (158) tarafından yapılan çalışmada *P. aeruginosa* için ilk yüksek riskli klon bildirimi yapılmıştır. Bu çalışmada KPC, NDM, VIM, IMP, SIM, GIM, GES, OXA-48, OXA-23 ve OXA-198 genleri PCR ile araştırılmıştır. Bu izolatların birinde VIM geni tespit edilmiş ve ileri sekans incelemesinde VIM-5 ürettiği saptanarak ST308 yüksek riskli klonuna ait olduğu gösterilmiştir. Bir diğer izolatta ise mevcut çalışılan karbapenemaz genleri saptanamamış ancak CIM pozitif saptanmış, ileri sekans incelemesinde ise IMP-7 ürettiği ve ST357 klonuna ait olduğu gösterilmiştir. Iraz ve ark. (159) tarafından yapılan çalışmada CRPA izolatları IMP, VIM, OXA ve GES karbapenemazlar açısından taranmış ileri sekans analizi sonucunda sınıf 1 integronda yerleşimli VIM-38 ve GES-5 saptanmıştır. Beşli ve ark. (160) tarafından yapılan çalışmada 334 CRPA izolatından 32'sinde MBL üretimi tespit edilmiş, bu izolatlardan IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM genleri araştırılmıştır. İzolatların 16'sında VIM ve 8'inde IMP tespit edilmiş, bir hastada ise hem VIM hem de IMP saptanmıştır. Vatansever ve ark. (161) tarafından yapılan çalışmada kolistin dirençli 11 *P. aeruginosa* izolatında IMP, NDM, OXA, VIM ve KPC karbapenemazlar taranmış, iki izolatta NDM saptanırken 11 izolatta ise NDM ve OXA-48 birlikteliği tespit edilmiş

ve ST235 klonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışma *P. aeruginosa* için Avrupa ve Türkiye’de NDM ve OXA-48 birlikteliği açısından ilk bildirim olmuştur. Çaycı ve ark. (162) tarafından yapılan çalışmada 200 CRPA çalışmaya dahil edilmiş olup IMP, VIM, NDM, GES, SPM, GIM ve SIM genleri araştırılmıştır. Bu izolatlardan birinde NDM, birinde ise VIM tespit edilmiştir. Çalışmamızda da ülkemizde yapılan çalışmalara benzer şekilde 103 CRPA izolatının 8’inde GES, 2’sinde NDM ve birinde VIM saptanmıştır. Dünyada *P. aeruginosa* izolatlarındaki karbapenemazları bildiren bazı çalışmalar Tablo 14’te açıklanmıştır.

Tablo 14. Dünyada *P. aeruginosa* izolatlarındaki karbapenemazları bildiren bazı çalışmalar

Çalışma	Yıl	Ülke	Karbapenemaz üreten izolat sayısı	Moleküler karakterizasyon	Referans
Dortet ve ark.	2012	Fransa	22	KPC (3), AIM (3), GIM (4), IMP (4), NDM (2), SPM (1), VIM (5)	(163)
Tijet ve ark.	2013	Kanada	13	GES (2), IMP (5), VIM (6)	(164)
Huang ve ark.	2014	Belçika	77	GES (2), KPC (1), GIM (1), IMP (9), NDM (1), SPM (1), VIM (58), OXA-198 (4)	(165)
Poirel ve ark.	2015	İsviçre	15	GES (2), KPC (1), FIM (1), GIM (1), IMP (4), NDM (1), SPM (1), VIM (4)	(166)
Kabir ve ark.	2016	İsveç	13	IMP (2), VIM (11)	(167)
Bernabeu ve ark.	2017	Fransa	30	GES (3), KPC (5), AIM (1), GIM (1), IMP (9), NDM (2), SPM (1), VIM (7), OXA-198 (1)	(168)
Rudresh ve ark.	2017	Hindistan	16	IMP + NDM (6), NDM (7), VIM (2), OXA-48 (1)	(169)
Hong ve ark.	2019	Kore	7	GES-5 (1), GES-24 (6)	(170)
Hu ve ark.	2021	Çin	180	KPC-2	(171)
Nakayama ve ark.	2022	Japonya	21	IMP-1 (16), IMP-7 (2), VIM-2 (2), IMP-10 + IMP-34 + IMP-41 (1)	(172)
Wendel ve ark.	2022	Almanya	20	VIM-1 (1), VIM-2 (17), VIM-4 (1), NDM-1 + GES-5 (1)	(173)

CRPA izolatlarında karbapenemaz enzimleri haricinde karbapenem direncinden sorumlu başka mekanizmalar da vardır. OprD porin kaybı ve dışa atım pompalarının aşırı aktivasyonu karbapenemazlar dışında sık görülen direnç mekanizmalarıdır. Bu direnç mekanizmalarını konu almış pek çok çalışma mevcuttur. Terzi ve ark. (174) tarafından yapılan bir çalışmada IPM'e dirençli 18 *P. aeruginosa* izolatının 13'ünde önemli ölçüde azalmış OprD ifadesi tespit edilmiştir. Fournier ve ark. (175) tarafından yapılan bir çalışmada IPM dirençli 109 *P. aeruginosa* izolatının 94'ünde (%86,2) mutasyon kaynaklı OprD kaybı tespit edilmiştir. Dobrevska ve ark. (176) tarafından yapılan bir çalışmada ise 29 ÇİD *P. aeruginosa* izolatında %97 oranında OprD kaybı ve %72 oranında MexXY-OprM dışa atım pompasında aşırı ekspresyon tespit edilmiştir. Müderris ve ark. (177) tarafından yapılan bir çalışmada 80 CRPA izolatının %55'inde OprD kaybı, %47,6'sında MexAB-OprM dışa atım sisteminde aşırı ekspresyon tespit edilmiş, 4 izolatta ise karbapenemaz üretimi, porin kaybı ve dışa atım pompasının aşırı ekspresyonu birlikte tespit edilmiştir. Çalışmamızda PCR ile karbapenemaz üretimi saptanamayan 92 izolat mevcut olup, bu izolatların karbapenem direncinde büyük paya sahip olan porin kaybıyla birlikte dışa atım pompalarının ve AmpC'nin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada araştırılan genler (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 ve GES) dışında saptanamayan başka karbapenemaz genlerinin (SIM, GIM, AIM, SPM vb.) de karbapenem direncine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

CRPA izolatlarında CZA direnç oranları dünya genelinde %38-%52 seviyelerine ulaşmıştır. CZA, sınıf B MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarına etkili değildir ve MBL üreten izolatlara %95'in üzerinde direnç bildirilmiştir. CRPA izolatlarında CZA direncinin sebepleri; antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu, kimyasal modifikasyon ile hedef bölge değişikliği (PBP2/PBP3), OprD porin kaybı, dışa atım pompalarındaki ve AmpC ekspresyonundaki artış gibi mekanizmalardır (86). Fraile-Ribot ve ark. (178) tarafından yapılan bir çalışmada OXA-2 mutantı olduğu gösterilen OXA-539'un CZA direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Lahiri ve ark. (179), yaptıkları çalışmada CZA dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında kromozomal AmpC mutasyonları tespit etmişlerdir. Bu izolatlarda CZA MİK değerleri 64-256 µg/mL arasında bulunmuştur. Atkin ve ark. (180) tarafından yapılan çalışmada CZA dirençli izolatlarda edinilmiş karbapenemazlar, AmpC gen ekspresyonu, OprD porin kaybı ve dışa atım pompalarının varlığı araştırılmış; izolatların %77,8'inde OprD porin kaybı gözlenirken, %66,7'sinde artmış

AmpC ekspresyonu, %22,2'sinde yüksek MexC ekspresyonu, %22,2'sinde orta düzeyde MexX ve MexA ekspresyonu saptanmıştır.

Çalışmamızda 2 NDM ve 1 VIM ürettiği gösterilen izolatta MBL üretimi nedeniyle CZA MİK değerleri 64 µg/mL ve üzerinde bulunmuştur. GES üreten 8 izolattave karbapenemaz saptanamayan 21 izolattada SMD ile CZA'a direnç tespit edilmiştir. GES üreten izolatların, serin karbapenemaz grubunda olması nedeniyle CZA'a duyarlı olması beklenmektedir. Ancak bu izolatlarda karbapenemazlar dışında çeşitli mekanizmaların birlikteliği (OprD kaybı, AmpC ekspresyonundaki artış, dışa atım pompası aktivasyonu vb.) nedeniyle CZA direnci görülebilmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Nichols ve ark. (181) tarafından yapılan bir çalışmada 2840 CRPA izolatının 85'inin MBL üretmeyen GES üreticisi olduğu saptanmış ve bunların 28'inin CZA'a dirençli olduğu tespit edilmiştir. Latin Amerika ülkelerini kapsayan bir sürveyans çalışmasında 750 *P. aeruginosa* izolatının 33'ünde GES karbapenemaz üretimi tespit edilmiş, GES üreten izolatların 24'ünde CZA direnci saptanmıştır (182). Kiratisin ve ark. (183) tarafından yapılan bir sürveyans çalışmasında ise GES tipi karbapenemaz üreten *P. aeruginosa* izolatlarında %37 oranında CZA'a direnç tespit edilmiştir.

Seftazidim avibaktam duyarlılığının hızlı bir şekilde belirlenmesi rutin laboratuvarlar için önemlidir. Rutin laboratuvarlar ÇİD *P. aeruginosa*'nın etkin tedavisine katkıda bulunmak amacıyla disk difüzyon gibi maliyet açısından uygun olan yöntemleri kullanmalıdır.

Karbapenemaz üreten *P. aeruginosa* izolatları, önemli bir küresel sağlık tehdidi olmaya devam etmektedir. Bakteriler arasındaki horizontal gen transferi sonucunda ÇİD *P. aeruginosa*'daki edinilen karbapenemaz genleri nozokomiyal enfeksiyonlar ve enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önem arz etmektedir. Karbapenemazların ve CZA'a direnç mekanizmalarının tanımlanması epidemiyolojik açıdan direnç yayılımını önlemede ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır. Direnç mekanizmalarının tanımlanması; uygun antibiyotiğin kullanılmasının yanı sıra hastanedeki yatış süresinin, mortalitenin ve morbiditenin azalmasını sağlamada katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Referans yöntem SMD ile 103 CRPA izolatının 71'i (%69) seftazidim avibaktama (CZA) duyarlı, 32'si (%31) CZA'a dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon ile izolatların 68'i (%66) CZA'ya duyarlı bulunmuş, 33'ü (%32) dirençli tespit edilmiştir. CZA'dan sonra en fazla duyarlılık gözlenen antimikrobiyal ajan amikasin olmuştur.
2. 103 CRPA izolatında disk difüzyon ve SMD yöntemlerinin sonuçları 98 izolatta uyumlu gözlenmiştir (Kategorik uyum: %95). İki izolatın disk difüzyon duyarlılık sonucu teknik belirsizlik alanı olarak yorumlanmış, iki izolat disk difüzyon yöntemine göre dirençli bulunurken SMD yöntemine göre duyarlı bulunmuş (BH: %5,7), bir izolat ise disk difüzyon yöntemine göre duyarlı bulunurken SMD yöntemine göre dirençli saptanmıştır (ÇBH: %3).
3. Daha önce yapılan çalışmalarla benzer şekilde, çalışmamızda disk difüzyon yönteminin BH oranı yüksek bulunmuştur. Bu nedenle CRPA izolatlarında CZA duyarlılığı araştırılırken disk difüzyon yönteminin CZA duyarlı izolatlarda güvenilir olduğu, dirençli veya teknik belirsizlik alanı sınırları içinde bulunan izolatlarda ise referans yöntemle bu duyarlılık sonucunun doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.
4. Karbapenemaz üretimi fenotipik olarak karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) ile araştırılmış ve PCR yöntemi ile karşılaştırılmıştır. 103 CRPA izolatının beşinde CIM sonucu pozitif bulunmuştur. PCR yöntemi ile bu izolatların ikisinde NDM geni ve birinde VIM geni tespit edilirken iki izolatta karbapenemaz geni saptanamamıştır. Karbapenemaz geni saptanamayan izolatlarda, çalışmamızda PCR ile araştırılmayan karbapenemazların CIM sonucunda pozitifliğe yol açabileceği düşünülmektedir.
5. PCR ile GES üreten 8 izolatın 6'sında CIM sonucu belirsiz olarak yorumlanmış, ikisinde ise negatif bulunmuştur. Bu sonuçların, GES üreticisi izolatların kısmi veya yavaş karbapenemaz aktivitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.
6. CIM, uygulanması kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ancak yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuç alınabilmesi nedeniyle CRPA izolatlarında karbapenemaz üretiminin kesin tayini için PCR yönteminin kullanılması gerektiği düşünülmektedir (Duyarlılık: %97,8, Özgüllük: %81,2, $P<0.001$).

7. NDM ve VIM tipi MBL üreticisi üç izolatta CZA MİK değerleri 64 µg/mL ve üzerinde saptandı. GES üreticisi izolatlarda MİK değerleri 16-128 µg/mL arasında saptandı. GES üreten izolatlarda karbapenemaz aktivitesine ek olarak porin kaybı ve dışa atım pompalarının aşırı aktivasyonu gibi mekanizmaların CZA direncine katkı sağladığı düşünülmektedir.
8. Çalışmamızda 103 CRPA izolatında, sık görülen karbapenemaz genleri PCR yöntemi ile araştırılmış, bir izolatta NDM, bir izolatta VIM ve 8 izolatta GES üretimi saptanmıştır. Bu karbapenemaz genlerinin, ülkemiz ve dünya genelindeki CRPA izolatlarında sık görülen genler olduğu tespit edilmiştir. Karbapenemazların ve CZA'a direnç mekanizmalarının tanımlanmasının enfeksiyon kontrolünü sağlamada, epidemiyolojik açıdan direnç yayılımını önlemede ve yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi açısından önem arz ettiği düşünülmektedir.
9. Çalışmamızın CRPA izolatlarındaki CZA duyarlılığı ve karbapenemaz direnç genlerinin yaygınlığı açısından bölgemiz ve ülkemiz adına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Ralte VSC, Loganathan A, Manohar P, Sailo CV, Sanga Z, Ralte L, et al. The Emergence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in Mizoram, Northeast India. *Microbiology Research*. 2022;13(3):342-349.
2. Zhang J, Li G, Zhang G, Kang W, Duan S, Wang T, et al. Performance Evaluation of the Gradient Diffusion Strip Method and Disk Diffusion Method for Ceftazidime-Avibactam Against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*: A Dual-Center Study. *Front Microbiol*. 2021;12:710526.
3. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3128.
4. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2021;12:614058.
5. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(7):521-528.
6. Daikos GL, da Cunha CA, Rossolini GM, Stone GG, Baillon-Plot N, Tawadrous M, et al. Review of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9):1126.
7. Gaibani P, Giani T, Bovo F, Lombardo D, Amadesi S, Lazzarotto T, et al. Resistance to Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam and Imipenem/Relebactam in Gram-Negative MDR Bacilli: Molecular Mechanisms and Susceptibility Testing. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(5):628.
8. Wang Q, Zhang F, Wang Z, Chen H, Wang X, Zhang Y, et al. Evaluation of the Etest and disk diffusion method for detection of the activity of ceftazidime-avibactam against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* in China. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):187.
9. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:926758.
10. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górka S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):78-91.
11. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*. 2020;166(1):30-33.

12. Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol*. 2015;6:214.
13. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Philadelphia, 2017:516-631.
14. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas*. In: Medical Microbiology. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 28th ed. McGraw-Hill Education, 2019:253–260.
15. Moore NM, Flaws ML. Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Lab Sci*. 2011;24(1):41-42.
16. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):42.
17. Jorgensen JH, Pfaller MA. *Pseudomonas*. In: Manual of Clinical Microbiology. 11th Edition. 2015:773-784.
18. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):199.
19. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*. 2009;37(5):1777-1786.
20. de Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12892.
21. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:39.
22. Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2021;246:126719.
23. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13(8):831-842.
24. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(1):61-66.
25. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas* and Related Bacteria. In: Medical Microbiology. 9th ed. 2021: 278-285.
26. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015;6(1):26-41.

27. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8671.
28. Newman JW, Floyd RV, Fothergill JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364(15).
29. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*. 2023;12(1):199.
30. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021;81(18):2117-2131.
31. Streeter K, Katouli M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical setting sand the environment. *Infect. Epidemiol. Med*. 2016; 2 (1):25-32.
32. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010;15(7):1037-1056.
33. Mizuno S, Matsuzaki S, Yokoyama K, Hamahata K, Yoshida A. Case Report: A Domestic Sponge Brush Used to Clean a Milk Feeding Bottle: The Source of Neonatal Meningitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Pediatr*. 2021;9:725940.
34. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*. 2011;2:150.
35. Sawa T, Momiyama K, Mihara T, Kainuma A, Kinoshita M, Moriyama K. Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiol Immunol*. 2020;64(5):331-344.
36. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4):e00031-19.
37. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*. 2015;21-22:41-59.
38. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*. 2021;10(12):1638.
39. Ibrahim D, Jabbour JF, Kanj SS. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2020;33(6):464-473.
40. Losito AR, Raffaelli F, Del Giacomo P, Tumbarello M. New Drugs for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with Limited Treatment Options: A Narrative Review. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(5):579.
41. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ; Antibacterial Resistance Leadership Group. A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clin Infect Dis*. 2019;69(8):1446-1455.

42. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)*. 2017;6(1):1.
43. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:823684.
44. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067.
45. De Angelis G, Del Giacomo P, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):5090.
46. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb Genom*. 2018;4(7):e000197.
47. Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):186.
48. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976.
49. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2015;17:11-21.
50. Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;75(13):1628-1649.
51. Aslan TA, Akova M. Infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical and molecular epidemiology and treatment strategies. *Infect Dis Clin Microbiol*. 2019;3:149-157.
52. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-458.
53. Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends*. 2016;10(1):14-21.
54. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):831-838.
55. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(2):e00047-19.
56. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8:13.
57. Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets*. 2016;17(9):1006-1028.

58. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(3):470-482.
59. El-Herte RI, Kanj SS, Matar GM, Araj GF. The threat of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Lebanon: an update on the regional and local epidemiology. *J Infect Public Health.* 2012;5(3):233-243.
60. van Duin D, Doi Y. The globalepidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8(4):460-469.
61. Kindu M, Derseh L, Gelaw B, Moges F. Carbapenemase-Producing Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli in Africa, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Microbiol.* 2020;2020:9461901.
62. Kracalik I, Ham DC, McAllister G, Smith AR, Vowles M, Kauber K, et al. Extensively Drug-Resistant Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Medical Tourism from the United States to Mexico, 2018-2019. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(1):51-61.
63. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(6):609-616.
64. Sahile Z, Shenkute D. The Epidemiology and Molecular Aspect of Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* (CPE). A Review. *J Inf Dis Trav Med.* 2022, 6(1): 000161.
65. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015;47(2):81-97.
66. Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(3):245-258.
67. Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241-263.
68. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-1606.
69. Poirel L, H  ritier C, Tol  n V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
70. Elshamy AA, Aboshanab KM. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Sci OA.* 2020;6(3):FSO438.
71. Al-Orphaly M, Hadi HA, Eltayeb FK, Al-Hail H, Samuel BG, Sultan AA, et al. Epidemiology of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Middle East and North Africa Region. *mSphere.* 2021;6(3):e00202-21.
72. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.

73. Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G, Beceiro A. New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the Way for the β -Lactams. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):9308.
74. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*. 2011;6
75. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):79-114.
76. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2012;3:408.
77. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, Rebold N, Rybak MJ. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther*. 2022;11(2):661-682.
78. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol*. 2015;10(10):1683-1706.
79. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018;78(6):675-692.
80. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:74.
81. Kanj SS, Bassetti M, Kiratisin P, Rodrigues C, Villegas MV, Yu Y, et al. Clinical data from studies involving novel antibiotics to treat multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;60(3):106633.
82. Coppola N, Maraolo AE, Onorato L, Scotto R, Calò F, Atripaldi L, et al. Epidemiology, Mechanisms of Resistance and Treatment Algorithm for Infections Due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: An Expert Panel Opinion. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(9):1263.
83. Lee M, Abbey T, Biagi M, Wenzler E. Activity of aztreonam in combination with ceftazidime-avibactam against serine- and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99(1):115227.
84. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S565-S575.
85. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev*. 2020;34(1):e00115-20.
86. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:18-27.
87. Almangour TA, Aljabri A, Al Musawa M, Almohaizeie A, Almuhsen S, Damfu N, et al. Ceftolozane-tazobactam vs. colistin for the treatment of infections due to multidrug-resistant

Pseudomonas aeruginosa: a multicentre cohort study. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;28:288-294.

88. Blomquist KC, Nix DE. A Critical Evaluation of Newer β -Lactam Antibiotics for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Ann Pharmacother*. 2021;55(8):1010-1024.

89. Soriano MC, Montufar J, Blandino-Ortiz A. Cefiderocol. *Rev Esp Quimioter*. 2022;35 Suppl 1(Suppl 1):31-34.

90. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Cefiderocol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(8):e0217120.

91. El-Lababidi RM, Rizk JG. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin. *Ann Pharmacother*. 2020;54(12):1215-1231.

92. Syed YY. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2021;81(13):1559-1571.

93. Martis N, Leroy S, Blanc V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *J Infect*. 2014;69(1):1-12.

94. Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Chemother*. 2017;23(1):1-11.

95. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 2015;119(5):1219-1233.

96. Muntean MM, Muntean AA, Preda M, Manolescu LSC, Dragomirescu C, Popa MI, et al. Phenotypic and genotypic detection methods for antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens (Review). *Exp Ther Med*. 2022;24(2):508.

97. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3):e0123690.

98. Akhi MT, Khalili Y, Ghotaslou R, Kafil HS, Yousefi S, Nagili B, et al. Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *J Chemother*. 2017;29(3):144-149.

99. Workneh M, Yee R, Simner PJ. Phenotypic Methods for Detection of Carbapenemase Production in Carbapenem-Resistant Organisms: What Method Should Your Laboratory Choose? *Clin Microbiol Newsletter*. 2019;41(2):11–22.

100. Amjad A, Mirza Ia, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol*. 2011;3(4):189-193.

101. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother*. 2016;28(1):1-19.
102. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11):e01140-18.
103. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods*. 2014;107:106-118.
104. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant *Enterobacterales*-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9):1140.
105. Al-Zahrani IA. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenge. *Saudi Med J*. 2018;39(9):861-872.
106. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):839-853.
107. Akpaka PE, Vaillant A, Wilson C, Jayaratne P. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Produced by Gram-Negative Bacteria in Trinidad and Tobago. *Int J Microbiol*. 2021;2021:5582755.
108. Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, Albayat H, Al-Adsani W, Sabour AA, et al. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(11):1675.
109. Sharma-Kuinkel BK, Rude TH, Fowler VG Jr. Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2016;1373:117-130.
110. Türe M, Altınok İ. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) Metodu ve Akuatik Organizmalarda Kullanımı. *SDU-JEFF*. 2013; 9(1): 44-54.
111. Cherak Z, Loucif L, Moussi A, Rolain JM. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in aquatic environments: a review. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;25:287-309.
112. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(4):427.
113. Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):255-266.
114. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1749-1755.
115. Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol*. 2020;129(4):806-822.

116. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 11.0 (January 2023). https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology
117. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 13.0. valid from 2023-01-01.
118. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. M100 33rd Ed.
119. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) reading guide for broth microdilution.
120. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3877-3880.
121. Bagheri Bejestani F, Hakemi-Vala M, Momtaheni R, Bagheri Bejestani O, Gholami M. The Frequency of *imp* and *vim* Genes Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Children's Medical Center of Tehran. *Arch Clin Infect Dis*. 2015;10(1):e60116.
122. Yaş R, Demiray Gürbüz E, Sarı AN, Gülay Z. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının hastanemizde yayılımı: Moleküler tiplendirme ve klonal ilişkinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2021;51(1):33-41.
123. Reig S, Le Gouvellec A, Bleves S. What Is New in the Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert?. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:909731.
124. Moyo S, Haldorsen B, Aboud S, Blomberg B, Maselle SY, Sundsfjord A, et al. Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is associated with sequence types 244 and 640 and the location of *bla*VIM-2 in a *Tn*C integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):682-685.
125. Park Y, Koo SH. Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect Drug Resist*. 2022;15:141-151.
126. Chen J, Liang Q, Chen X, Wu J, Wu Y, Teng G, et al. Ceftazidime/Avibactam versus Polymyxin B in the Challenge of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Infect Drug Resist*. 2022;15:655-667.
127. Tuan Soh TS, Salvinder S, Chen VSY. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against clinical isolates of *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* collected in Malaysia: Results from the ATLAS Programme, 2013 to 2019. *Med J Malaysia*. 2022;77(2):174-184.
128. Karaïskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health*. 2019;7:151.

129. Cruz-López F, Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Maldonado-Garza HJ, Garza-González E. Efficacy and In Vitro Activity of Novel Antibiotics for Infections With Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:884365.
130. Ragbetli C. , Güdücüoğlu H. , Parlak M. Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edilen Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter* and *Pseudomonas* İzolatlarında Karbapenem Direncinin Araştırılması. *J Contemp Med*. 2019; 9(3): 275-279.
131. Aydemir Ö, Terzi HA, Köroğlu M, Altındış M. In Vitro Activity of Ceftolozane/tazobactam and Ceftazidime/avibactam Against Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*. 2019;8:5.
132. Cetinkol Y, Yildirim A, Calgin M. Evaluation of ceftazidime-avibactam efficacy in gram negative bacteria. *Turk J Vasc Surg* 2022;11(3):1040-3
133. Mirza HC, Hortaç E, Koçak AA, Demirkaya MH, Yayla B, Güçlü AÜ, et al. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against clinical isolates of meropenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*: A two-centre study. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;20:334-338.
134. Hosbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Özcan H, Gumral R. In vitro activity of ceftazidime-avibactam and colistin against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Ist Faculty Med*. 2022;85(3):355-61.
135. Zalas-Więcek P, Prażyńska M, Pojnar Ł, Pałka A, Żabicka D, Orczykowska-Kotyna M, et al. Ceftazidime/Avibactam and Other Commonly Used Antibiotics Activity Against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Poland in 2015-2019. *Infect Drug Resist*. 2022;15:1289-1304.
136. Liao CH, Lee NY, Tang HJ, Lee SS, Lin CF, Lu PL, et al. Antimicrobial activities of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, and other agents against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intensive care units in Taiwan: results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan in 2016. *Infect Drug Resist*. 2019;12:545-552.
137. Manzke J, Stauf R, Neumann B, Molitor E, Hischebeth G, Simon M, et al. German Multicenter Study Analyzing Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam of Clinical Meropenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Using a Commercially Available Broth Microdilution Assay. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(5):545.
138. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Valente MLNF, Luengas EL, Baudrit M, Quintana A, et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Latin America as part of the ATLAS global surveillance program, 2017-2019. *Braz J Infect Dis*. 2021;25(6):101647.

139. Grupper M, Sutherland C, Nicolau DP. Multicenter Evaluation of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Inhibitory Activity against Meropenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* from Blood, Respiratory Tract, and Wounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10):e00875-17.
140. Han R, Shen S, Yin D, Ding L, Shi Q, Yang Y, et al. Performance of Ceftazidime-Avibactam 30/20- μ g and 10/4- μ g Disks for Susceptibility Testing of *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr*. 2023;e0272022.
141. Daragon B, Fournier D, Plésiat P, Jeannot K. Performance of disc diffusion, MIC gradient tests and Vitek 2 for ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(10):2586-2592.
142. Schaumburg F, Bletz S, Mellmann A, Becker K, Idelevich EA. Comparison of methods to analyse susceptibility of German MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime/avibactam. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(2):255-260.
143. Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *Yale J Biol Med*. 2022;95(4):507-515.
144. Gill CM, Oliver A, Fraile-Ribot PA, Nicolau DP. In vivo translational assessment of the GES genotype on the killing profile of ceftazidime, ceftazidime/avibactam and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(10):2803-2808.
145. Brauncajs M, Bielec F, Macieja A, Pastuszek-Lewandoska D. Carbapenem-Resistant Gram-Negative Fermenting and Non-Fermenting Rods Isolated from Hospital Patients in Poland-What Are They Susceptible to?. *Biomedicines*. 2022;10(12):3049.
146. Hagemann JB, Pfennigwerth N, Gattermann SG, von Baum H, Essig A. KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1812-1814.
147. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640.
148. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4828-4833.
149. Esenkaya Taşbent F, Özdemir M. *Pseudomonas* suşlarında OXA tipi karbapenemazların varlığı: Türkiye'den ilk bildirim. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(1):26-34.
150. Gutiérrez S, Correa A, Hernández-Gómez C, De La Cadena E, Pallares C, Villegas MV. Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019;37(10):648-651.

151. Gill CM, Nicolau DP; ERACE-PA Global Study Group. Phenotypic and genotypic profile of ceftolozane/tazobactam-non-susceptible, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2022;78(1):252-256.
152. Lisboa LF, Turnbull L, Boyd DA, Mulvey MR, Dingle TC. Evaluation of a Modified Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2017;56(1):e01234-17.
153. Ferjani S, Maamar E, Ferjani A, Kanzari L, Boubaker IBB. Evaluation of Three Carbapenemase-Phenotypic Detection Methods and Emergence of Diverse VIM and GES Variants among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Tunisia. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(7):858.
154. Gill CM, Lasko MJ, Asempa TE, Nicolau DP. Evaluation of the EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):e02015-19.
155. Song W, Kim HS, Kim JS, Kim HS, Shin DS, Shin S, et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.*. *Ann Clin Microbiol*. 2016;19(4):83-87.
156. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist*. 2017;23(3):328-334.
157. Vural E, Delialioğlu N, Tezcan Ulger S, Emekdas G, Serin MS. Phenotypic and Molecular Detection of the Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical Samples. *Jundishapur J Microbiol*. 13(2):e90034.
158. Çekin ZK, Dabos L, Malkoçoğlu G, Fortineau N, Bayraktar B, Iorga BI, et al. Carbapenemase -producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey: first report of *P. aeruginosa* high-risk clones with VIM-5- and IMP-7-type carbapenemases in a tertiary hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99(1):115174.
159. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, Bonnin RA, Ceylan A, Saral A, et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(3):292-294.
160. Beşli Y, Bayramoğlu G, Tosun İ, Kaklıkkaya N, Aydın F. Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of Metallo-beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*. 2018;7:30.
161. Vatansever C, Menekse S, Dogan O, Gucer LS, Ozer B, Ergonul O, et al. Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):152-154.

162. Tanriverdi Cayci Y, Biyik İ, Birinci A. VIM, NDM, IMP, GES, SPM, GIM, SIM Metallobetalactamases in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Turkish University Hospital. *J Arch Mil Med*. 2022;10(1):e118712.
163. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6437-6440.
164. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4578-4580.
165. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae* and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):3060-3063.
166. Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol*. 2015;53(9):3003-3008.
167. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(5):1213-1216.
168. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the β -CARBA™ test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(6):1646-1658.
169. Rudresh SM, Ravi GS, Sunitha L, Hajira SN, Kalaiarasan E, Harish BN. Simple, rapid, and cost-effective modified Carba NP test for carbapenemase detection among Gram-negative bacteria. *J Lab Physicians*. 2017;9(4):303-307.
170. Hong JS, Choi N, Kim SJ, Choi KH, Roh KH, Lee S. Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. *Microb Drug Resist*. 2020;26(6):605-610.
171. Hu Y, Liu C, Wang Q, Zeng Y, Sun Q, Shu L, et al. Emergence and Expansion of a Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone Are Associated with Plasmid-Borne *bla*_{KPC-2} and Virulence-Related Genes. *mSystems*. 2021;6(3):e00154-21.
172. Nakayama R, Inoue-Tsuda M, Matsui H, Ito T, Hanaki H. Classification of the metallo β -lactamase subtype produced by the carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Japan. *J Infect Chemother*. 2022;28(2):170-175.
173. Wendel AF, Malecki M, Mattner F, Xanthopoulou K, Wille J, Seifert H, et al. Genomic-based transmission analysis of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care centre in Cologne (Germany) from 2015 to 2020. *JAC Antimicrob Resist*. 2022;4(3):dlac057.

174. Agah Terzi H, Kulah C, Riza Atasoy A, Hakki Ciftci I. Investigation of OprD Porin Protein Levels in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(12):e25952.
175. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(8):1772-1780.
176. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobрева E, Velinov T, et al. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist.* 2013;19(5):355-361.
177. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydoğan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries.* 2018;12(1):1-8.
178. Fraile-Ribot PA, Mulet X, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Juan C, Pérez JL, et al. In Vivo Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin- β -Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2 β -Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e01117-17.
179. Lahiri SD, Walkup GK, Whiteaker JD, Palmer T, McCormack K, Tanudra MA, et al. Selection and molecular characterization of ceftazidime/avibactam-resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa* strains containing derepressed AmpC. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1650-1658.
180. Atkin SD, Abid S, Foster M, Bose M, Keller A, Hollaway R, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputum of patients with cystic fibrosis demonstrates a high rate of susceptibility to ceftazidime-avibactam. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1499-1510.
181. Nichols WW, de Jonge BL, Kazmierczak KM, Karlowsky JA, Sahm DF. In Vitro Susceptibility of Global Surveillance Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to Ceftazidime-Avibactam (INFORM 2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(8):4743-4749.
182. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, de Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* Collected in Latin American Countries: Results from the INFORM Global Surveillance Program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(4):e01814-18.
183. Kiratisin P, Kazmierczak K, Stone GG. In vitro activity of ceftazidime/avibactam and comparators against carbapenemase-producing *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected globally between 2016 and 2018. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;27:132-141.
184. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Prevalence and Molecular Typing of Colistin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) Among β -Lactamase-Producing Isolates: A Study Based on High-Resolution Melting Curve Analysis Method. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2943-2955.

8. EKLER

8.1. Ek.1 Etik Kurul Kararı

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 06/04/2022 tarihli ve 2022-32 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

