



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS
AERUGINOSA'NIN KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ VE
TİPLENDİRİLMESİNDE FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HATİCE KARALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. M. BURAK AKSU
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS
AERUGINOSA'NIN KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ VE
TİPLENDİRİLMESİNDE FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HATİCE KARALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. M. BURAK AKSU
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

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

Hatice KARALI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren, sonsuz sabır göstererek her türlü olanağı sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan, değerli danışman hocam Doç. Dr. Burak AKSU'ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel fikir ve düşünceleriyle yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Arzu İLKİ, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR, Prof. Dr. Nurver ÜLGER ve Dr. Öğr. Üyesi Elvan SAYIN'a,

Tez çalışmamda her zaman destek olan, yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Doç. Dr. Gülşen ALTINKANAT GELMEZ, Arş. Gör. Dr. Deniz GÜNEŞER ve Mehmet Mücahit GÜNCÜ'ye,

Yüksek lisansa başladığım günden beri manevi destekleriyle yanımda olan, birlikte olmaktan mutluluk duyduğum ve güzel anılar biriktirdiğim Şura BAŞDAĞ, Aleyna ÖZKAR ve Şükrü ŞEN başta olmak üzere tüm yüksek lisans arkadaşlarıma, asistan doktor arkadaşlarıma ve laboratuvar personeline,

Hayatım boyunca aldığım her kararda destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, büyük özverilerle beni yetiştiren, bu günümü borçlu olduğum anneme ve babama, beni yürekten destekleyen kardeşlerime,

sonsuz teşekkür ederim.

Hatice KARALI

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığı tarafından Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karbapenemaz Üretimi ve Tiplendirilmesinde Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Değerlendirilmesi başlıklı 11039 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
4.1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın morfolojisi, kültür ve biyokimyasal özellikleri	5
4.1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın epidemiyolojisi ve klinik önemi	7
4.1.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın genetik özellikleri ve yüksek riskli klonlar	9
4.1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da antimikrobiyal direnç ve mekanizmaları	10
4.1.4.1. Antibakteriyellerin etki mekanizması.....	11
4.1.4.2. Karbapenemler ve karbapenemlere karşı gelişen direnç	12
4.1.4.2.1. Dış membran porin defekti	14
4.1.4.2.2. Dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu	14
4.1.4.2.3. Karbapenemazlar	15
4.2. Tedavi, Korunma ve Kontrol.....	17
4.3. Karbapenem Direncinde Karbapenemazların Rolü.....	17
4.4. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	19
4.4.1. Karbapenemazların tanısında kullanılan fenotipik testler	20
4.4.1.1. Karbapenem ile inhibitörler arasındaki sinerji temelli testler	20
4.4.1.2. Karbapenem hidrolizine dayanan testler	21
4.4.1.2.1. Biyokimyasal testler	21
4.4.1.2.2. Karbapenem inaktivasyon metodu	22
4.4.1.2.3. Modifiye Hodge testi.....	22
4.4.1.2.4. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrofotometresi (MALDI-TOF MS)	23
4.4.1.3. Lateral akım yöntemleri (İmmünokromatografik yöntemler)	23
4.4.2. Karbapenemazların tanısında kullanılan genotipik testler.....	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Gereçler.....	25
5.3. Yöntemler.....	27
5.3.1. Karbapenemaz üretiminin fenotipik tespiti	27

5.3.2. Karbapenemaz üretiminin genotipik (PZR) tespiti	30
5.3.3. Verilerin istatistiksel analizi	32
6. BULGULAR	33
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
8. KAYNAKLAR	46
9. BİLİMSEL FAALİYETLER	59

KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC	:	American type culture collection
CAESAR	:	Central Asia and Europe antimicrobial resistance surveillance annual report
Carba NP	:	Carbapenemase Nordmann-Poirel
CCUG	:	Culture Collection University of Gothenburg
CDC	:	Center for disease prevention and control
CİM	:	Karbapenem inaktivasyon metodu
CLSI	:	Clinical and laboratory standards institute
DPA	:	Dipiklonik asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DTA	:	Derin trekeal aspirat
DTR	:	Tedavisi zor dirençli
ECDC	:	European centre for disease prevention and control
eCİM	:	EDTA ilaveli karbapenem inaktivasyon metodu
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EF-2:	:	Elongasyon Faktör-2
EUCAST	:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FBA	:	Fenilboranik asit
GES	:	Guyana extended spectrum
GİM	:	German imipenemase
GSBL	:	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazlar
İMİ	:	İmipenemhidroliz
İMP	:	Imipenem-resistant <i>Pseudomonas</i>
KPC	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase

MALDI-TOF MS	:	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi
MBL	:	Metallo beta-laktamazlar
mCIM	:	Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu
MDR	:	Çok ilaca dirençli
MHA	:	Mueller-Hinton agar
MHT	:	Modifiye Hodge testi
NCTC	:	National collection of type cultures
OXA	:	Oksasilinaz
PBP	:	Penisilin bağlayan protein
PDR	:	Tüm ilaçlara dirençli
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RND	:	Nodülasyon bölümü
SİM	:	Seoul imipenemase
SME	:	<i>Serratia marcescens</i> enzime
TBE	:	Tris/Borate/EDTA
VİM	:	Verona integron-encoded metallo-beta -laktamase
XDR	:	İki veya daha az sayıda antimikrobiyal kategorideki en az bir maddeye duyarlı olarak ilaçların çoğuna dirençli
YBÜ	:	Yoğun bakım ünitesi

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. Tıbbi önemi olan <i>Pseudomonas</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri (Procop ve ark., 2017 ve Jorgensen ve ark., 2015'ten yararlanılarak hazırlanmıştır.).....	7
Tablo 2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın diğer virülans faktörleri (Erdem, 1999'dan yararlanılarak hazırlanmıştır.).....	8
Tablo 3. Beta-laktamazların sınıflandırılması (Karaaslan ve Soysal 2017'den yararlanılarak hazırlanmıştır).....	15
Tablo 4. Karbanemazlara inhibitör temelli yaklaşım.....	21
Tablo 5. PZR karışımlarının içeriği	31
Tablo 6. PZR'de kullanılan primerler ve amplifikasyon koşulları	301
Tablo 7. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin sonucunun PZR sonucu ile karşılaştırılması	33
Tablo 8. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı (n=120).....	34
Tablo 9. Çalışmanın fenotipik ve genotipik test sonuçları	35

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. ECDC 2021 verilerine göre ülkelere göre karbapenemlere (imipenem/meropenem) dirençli invaziv <i>P. aeruginosa</i> izolatların yüzdesi (ECDC, 2023).....	13
Şekil 2. Karbapenem direnç mekanizmaları.....	14
Şekil 3. Karbapenemaz üreten <i>P. aeruginosa</i> 'nın dünyadaki dağılımı (Yoon ve ark., 2021) ..	18
Şekil 4. Enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli fenotipik yöntemde pozitif izolat içeren tüpün zamana bağlı değişen görüntüsü.....	29
Şekil 5. Karbapenemaz varlığında enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli testte kontrol tüpü ve test tüpünün görüntüsü	29
Şekil 6. bla _{KPC} , bla _{NDM} , bla _{IMP} , bla _{VIM} ve bla _{OXA-48} genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. 1: Negatif kontrol, 2-3: VİM,4-5: NDM, 6-7: OXA-48, 8-9: İMP, 10-11: GES pozitif izolat ve Marker.....	32
Şekil 7. PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı.....	34

1. ÖZET

Tezin başlığı: Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karbapenemaz Üretimi ve Tiplendirilmesinde Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı Soyadı : Hatice Karali

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. M. Burak Aksu

Programın Adı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

Amaç: Son on yılda karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının artışı enfeksiyon tedavisinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Rutin laboratuvarında karbapenem direncinin saptanması için gereken süre yaklaşık 48 saattir. Bu durum, özellikle kritik hastalarda etkili tedavinin başlatılmasında gecikmeye neden olur. Bu nedenle çalışmalar antimikrobiyal direncin daha erken tespit edilmesi için yeni yöntemlere odaklanmaktadır. Bu çalışmada, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz üretimine bağlı direncin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 2018 ile Şubat 2023 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 120 *P. aeruginosa* izolatı rutin antibiyogram sonuçlarına bakılarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Karbapenemaz üretimi fenotipik test olarak enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik yöntem ve genotipik test olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada karbapenem dirençli 100 izolatın 46'sında (%46) genotipik yöntemle karbapenemaz kodlayan genler tespit edilmiştir. Fenotipik test ile karbapenemaz enzimi taşıyan 46 izolatın 31'inde (%67) 1 saat içinde pozitif sonuçlar kaydedilmiştir. Geriye kalan 15 izolat yanlış negatif olarak; moleküler yöntem ile direnç genlerini taşımadığı belirlenen 2 izolat ise yanlış pozitif olarak değerlendirilmiştir. Fenotipik testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %67,4 ve %97,3 ($p < 0,0001$) olarak bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hızlı ve doğru tanımlanması, zamanında uygun tedavinin verilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin başarılı bir şekilde uygulanması açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin performansının değerlendirilebilmesi için daha fazla örnek içeren *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotik direnci, karbapenem, karbapenemaz, fenotipik test

2. SUMMARY

Title of Thesis: Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Carbapenemase Production and Typing In *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Various Clinical Samples

Student Name, Surname: Hatice Karali

Supervisor Name : Assoc. Prof. Dr. M. Burak Aksu

Program Name : Microbiology and Clinical Microbiology Master's Program

Objective: The increase in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates has become an important health problem in infection treatment in the last decade. The time required to detect carbapenem resistance in the routine laboratory setting is about 48 hours. So, it causes a delay in the initiation of effective treatment, especially in critically ill patients. For this reason, studies focus on new methods to detect antimicrobial resistance earlier. It aimed to investigate carbapenemase-dependent resistance by phenotypic and genotypic methods in carbapenem-resistant clinical *P. aeruginosa isolates* in this study.

Materials and Methods: A hundred twenty *P. aeruginosa* isolates obtained from clinical samples between January 2018 to February 2023 in in our hospital microbiology laboratory, were included in our study based on routine antibiogram results. Carbapenemase production was detected by enzyme-substrate reaction-based colorimetric method as a phenotypic test and polymerase chain reaction as a genotypic test.

Results: In this study, carbapenemase-coding genes were detected in 46 (46%) of 100 carbapenem-resistant isolates by genotypic method. With the phenotypic test, positive results were recorded within 1 hour in 31 of 46 isolates (67%) carrying the carbapenemase enzyme. The remaining 15 isolates were false negatives; 2 isolates determined not to carry the resistance genes by molecular method were evaluated as false positives. The sensitivity and specificity of the phenotypic test were 67,4% and 97,3%, respectively ($p < 0,0001$).

Conclusion: In conclusion, rapid and accurate identification of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates is very important for the timely administration of appropriate treatment and successful implementation of infection control measures. *In vitro* studies with a larger number of samples are needed to evaluate the performance of the enzyme-substrate reaction-based colorimetric test that we used in our study.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, carbapenem, carbapenemase, phenotypic test

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa, karbapenem grubu da dahil birçok sınıfta yer alan antibiyotiklere karşı hızla geliştirdiği direnç nedeni ile tedavide önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zhang ve ark., 2016). Antibiyotik direnci, ulusal ve uluslararası kuruluşların raporlarına göre, enfeksiyon hastalıklarının tedavi etkinliğini büyük ölçüde sınırlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2017 yılında yayınlanan raporuna göre, karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnç sonuçlarının 20 bakteri türü arasında ikinci sırada yer aldığı ve kritik öncelikli bir bakteri olduğu bildirilmiştir (Tacconelli ve ark., 2018). Ek olarak, *P. aeruginosa* Amerikan Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (CDC) 'İnsan Sağlığı için Ciddi Tehdit Oluşturan Bakteriler' listesinde yer almaktadır (CDC, 2019).

P. aeruginosa'da karbapenemlere direnç gelişiminde Operon D (OprD) porin proteini kaybı, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz üretimi gibi farklı direnç mekanizmaları rol oynar (Jean ve ark., 2022). Son yıllarda *P. aeruginosa*'da karbapenemlere karşı gelişen direnç oranının hızla arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, karbapenemaz üretimine bağlı direnç gelişimi de sık sık rapor edilmektedir (Çopur ve ark. 2021).

Karbapenem direnci daha yüksek morbidite ve mortalite oranları, maliyetin artması ve hastanede yatış süresinin uzaması ile sonuçlanmaktadır (Shaaban ve ark., 2017). Dolayısıyla karbapenemaz enzimlerinin varlığının hızlı tespit edilmesi antimikrobiyal yönetimin ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin erken aşamada etkili olabilmesi için önemlidir (Osei ve ark., 2015). Genotipik testler, direnç genlerinin tespit edilmesinde altın standarttır. Genotipik yöntemler deneyimli personel gerektirmesi ve pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir (Malkoçoğlu ve ark., 2017). Bu nedenle rutin laboratuvarında uygulanabilmesi için karbapenemaz üretimini hızlı tespit eden, basit, güvenilir ve uygun maliyetli testlere ihtiyaç vardır (Aktaş ve ark., 2017 ve Osei ve ark., 2015). Son yıllarda, karbapenemazların fenotipik olarak saptanması amacıyla birçok farklı yöntem (Modifiye Hodge testi, Karbapenem İnaktivasyon Metodu, Carba NP test vb.) geliştirilmiştir. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, karbapenemaz aktivitesinin saptanması için geliştirilen fenotipik yöntemlerden biridir. Bu yöntem karbapenemlerin beta-laktam halkasının enzimatik hidrolizi sonucu oluşan pH değişikliğine bağlı olarak pH indikatöründe renk değişimi ile karbapenemaz üretiminin tespitini sağlar (Nordmann ve ark., 2012).

Çalışmamızda klinik *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinde öne çıkan mekanizma olan karbapenemaz varlığının enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, bitki, hayvan ve insanda geniş bir yayılım gösteren aynı zamanda karmaşık antibiyotik direnç mekanizmalarıyla öne çıkan, çoklu ilaca dirençli bir patojendir (Diggle ve Whiteley, 2020). Özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi idrar yolu enfeksiyonu gibi sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son 40 yıldır nazokomiyal enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (Poole, 2011).

P. aeruginosa'nın keşfi Sedillot'un 1850'de pansumanlarda yeşil-mavi renk cerahat bulunduğunu tespit etmesiyle başlamıştır. Ardından 1862'de Luke, yeşil-mavi püyün mikroskop altında çomak şeklinde organizmalar içerdiğini gözlemlemiştir (Al-Wrafy ve ark., 2017). Bu organizmalar 1882'de Gessard tarafından askerlerin yara enfeksiyonlarından saf kültür halinde izole edilmiştir ve ilk kez 1894'te Migula tarafından *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. 1900'lerin sonlarına doğru, insan vücudunun neredeyse tüm bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. (Diggle ve Whiteley, 2020).

P. aeruginosa; *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi diğer önemli patojenik bakteri türleriyle karşılaştırıldığında daha virüldür. Bununla birlikte büyük bir kolonizasyon potansiyeline ve biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olması *P. aeruginosa*'yı en korkulan patojenlerden biri yapmaktadır (Høiby ve ark., 2010).

4.1.1. *P. aeruginosa*'nın morfolojisi, kültür ve biyokimyasal özellikleri

Pseudomonadaceae familyasında yer alan *P. aeruginosa*, 1,5-3,0 µm boyutunda, sporsuz, kapsülsüz, tek veya çoklu polar flagellaya sahip olması nedeniyle hareketli ve aerop gram negatif basildir. Bakterinin dış yüzeyi, farklı şartlarda konağın bağışıklık sistemi cevabından kurtulmasını sağlayan aljinitasit yapısındaki polisakkaritlerden oluşan kapsüle benzeyen glikokaliks (slime) tabakasıyla kaplıdır (Pottinger ve ark., 2014). Ayrıca çeşitli kronik enfeksiyonlarda ve farklı tıbbi cihazların yüzeylerinde antibiyotiklere karşı direnç gelişimine sebep olan biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir (Murray ve ark., 2007; Brooks ve ark., 2013).

P. aeruginosa 37 ila 42°C arasındaki sıcaklıklarda optimal büyüme göstermektedir. Besin ihtiyaçları oldukça basit olan bu bakteri; koyun kanlı agar, Mueller-Hinton agar (MHA), MacConkey agar, nutrient agar ve çukulata agar gibi rutin kullanım besiyerlerinde 24-48 saat inkübasyon süresinde rahatlıkla üreyebilmektedir. 2-amino asetofenon üretimi sonucunda oluşan karakteristik meyvemsi veya üzüm benzeri kokusuyla bilinen kendine özgü bir kokuya sahiptir. Besiyerlerinde farklı tiplerde koloni morfolojine rastlanabilmektedir. Genel olarak katı besiyerinde hızlı üreyen tipik olarak yuvarlak, konveks, pürüzlü veya düzgün kenarlı ve daha seyrek görülen mukoid bir koloni görünümüne sahiptir. Ayrıca kanlı agarda beta hemoliz yapar, yeşilimsi parlaklık ve R tipi koloniler oluşturmaktadır (Forbes ve ark., 2002; Murray ve ark., 2007; Pottinger ve ark. 2014).

P. aeruginosa'nın bir diğer karakteristik özelliği pigment üretmesidir. Piyoverdin, piyosiyanın, piyorubrin (kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) gibi suda çözünen pigmentler üretebilmektedir. *P. aeruginosa* suşlarında piyosiyanın ve piyoverdin yaygın olarak görülmektedir. Piyoverdin, düşük demirli ortamlarda siderofor görevi gören kısa dalga boyu UV ışığında sarı-yeşil veya sarı-kahverengi floresan üreten bir pigmenttir. Piyosiyanın, demir metabolizmasında işlev gören alkali pH aralığında kolonilere mavi-yeşil renk veren bir pigmenttir. Piyosiyanın, yalnızca *P. aeruginosa* tarafından üretilmektedir (Pottinger ve ark., 2014; Brooks ve ark., 2013).

P. aeruginosa'nın 42°C'de üreyebilmesi, koloni kokusu ve morfolojisi, pozitif oksidaz reaksiyonu, fermentasyon yapmaması ve pigment üretimi tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır (Brooks ve ark. 2013). *P. aeruginosa*'nın tanımlanmasında, piyoverdin ya da piyosiyanın üretimini arttıran ve diğer bakterileri inhibe eden Setrimid agar, King A ve King B seçici besiyeri de kullanılabilir (Behzadi ve ark., 2021).

P. aeruginosa'nın diğer biyokimyasal özellikleri şunlardır; oksidaz, sitrat ve katalaz tepkimeleri pozitif; Metil-Red ve Voges-Proskauer testleri negatiftir. Oksidazın pozitif olması *P. aeruginosa*'yı *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayıran spesifik özelliğidir. Non-fermentatiftirler, glikozu oksidasyon yoluyla parçalayarak asit oluşturabilmektedir (Murray ve ark., 2007). Tıbbi önemi olan *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Tıbbi önemi olan *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri (Procop ve ark., 2017 ve Jorgensen ve ark., 2015'ten yararlanılarak hazırlanmıştır.)

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	+	-	+	+/-	+
Beta-hemoliz	+	+	+/-	-	-
Jelatinaz	+/-	+	-	-	-
Lesitinaz	+/-	+/-	-	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-
Piyosiyenin	+/-	-	-	-	-
Piyoverdin	+	+	+	-	-
Nitrat redüksiyonu	+	+/-	-	+	+
Nitrattan gaz oluşumu	+/-	-	-	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	-	+
Sitrat kullanımı	+	+	+	+/-	+
İndol	-	-	-	-	-
Üre	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Asetamid kullanımı	+	-	-	-	-
Maltozdan asit oluşturma	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Laktozdan asit oluşturma	-	-	-	-	-

'+' : Pozitif, '-' : Negatif

4.1.2. *P. aeruginosa*'nın epidemiyolojisi ve klinik önemi

P. aeruginosa insan yaşamını önemli ölçüde tehdit eden nazokomiyal enfeksiyonların önemli bir kaynağıdır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının gelişimi üç aşamada gerçekleşmektedir: başlangıçta, bakteri pili aracılığıyla mukozaya tutunup sadece yerleşir (kolonizasyon), ardından dokulara yayılır (invazyon) ve son olarak vücuda sistemik olarak yayılmaktadır (sistemik yayılma). Enfeksiyon, kolonizasyon aşamasında durabilir veya daha fazla yayılarak sistemik enfeksiyon oluşturabilmektedir. Enfeksiyonun gelişiminde bakterinin virülans faktörleri ve konağın immün sistemi belirleyici olmaktadır (Murray ve ark., 2007).

P. aeruginosa; biyofilm oluşumu, kirpik (flagella), pili (fimbriae), lipopolisakkarit, piyoverdin, piyosiyenin, ekzotoksin A gibi bir dizi virülans faktörüne sahiptir. Virülans faktörleri, bakterinin konak kolonizasyonuna ve konağa ait hücrelerin hasara uğratmasına yardımcı olmaktadır (May ve ark., 1991). Böylece, *P. aeruginosa*'nın enfeksiyon oluşturma kapasitesini

artırabilir ve hastalık semptomlarını şiddetli hale getirebilmektedir (Pottinger ve ark., 2014). *P. aeruginosa*'nın diğer virülans faktörleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. *P. aeruginosa*'nın diğer virülans faktörleri (Erdem, 1999'dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Virülans Faktörleri	Fonksiyonu
Yapısal Faktörler	
Kapsül:	Mukoid polisakkaridin yapılması Biyofilm oluşumuna katkı sağlaması Adhezyon ve kolonizasyon sağlanması Antibiyotiklerin bakterisidal etkisinin azaltılması. Nötrofil ve lenfosit aktivasyonunun önlenmesi.
Nöraminidaz:	Pilusların adhezyonunun kolaylaştırılması
Piluslar ve Non-pilus Adezinler:	Akciğer ve yara bölgesine adhezyonun sağlanması
Lipopolisakkarid:	Endotoksik aktivite Bazı antibiyotiklere direnç kazanılması
Piyosyanin:	İnflamasyonun başlatılması Reaktif oksijen türlerinin üretimi salınması Doku hasarı
Aljinat (Slime Tabakası)	Tutunma ve fagositozun engellenmesi Bazı antibiyotiklere direnç sağlanması
Toksin ve Enzimler	
Ekzotoksin A:	Protein sentezinin, EF-2'yi etkileyerek önlenmesi Doku hasarının oluşması
Ekzotoksin S:	Fagositozun engellenmesi
Elastaz, Alkalın Proteaz:	Damarlar ve akciğerin hasarlanması
Fosfolipaz C:	Doku hasarı ve bağışıklık sisteminden korunması

*EF-2: Elongasyon Faktör-2

P. aeruginosa'nın kuru ve cansız yüzeylerde 6 aya kadar canlı kalarak hastane ortamına kolaylıkla uyum sağlayabilmesi sayesinde hastane salgınlarına neden olabilmektedir. Son yıllarda, hastanelerde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında artışlar yaşanmaktadır (Liao ve ark., 2022; Brooks ve ark., 2013). Karbapenem dirençli izolatların %90'ından fazlasının sağlık hizmeti almış hastalardan izole edildiği bildirilmiştir. Bu durum, *P. aeruginosa*'nın nozokomiyal enfeksiyonlarda kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir (Reynolds ve Kollef, 2021).

Gram negatif bakteriler söz konusu olduğunda, *P. aeruginosa* yanıkların ve yara sepsisinin; bağışıklığı baskılanmış kişilerde bakteriyemiye neden olan hastane kaynaklı idrar yolu

enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir (Abbas ve ark., 2018). *P. aeruginosa*, ventilatörle ilişkili pnömoni vakalarında *S. aureus*'tan sonra ikinci sırada gelir ve izolatların %10-20'sini oluşturmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarının en sık üçüncü nedeni ve cerrahi yara enfeksiyonlarının da en sık dördüncü nedenidir (Reynolds ve Kollef, 2021).

Genellikle solunum sistemi enfeksiyonları, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, üriner enfeksiyonlar, endokardit, bakteryemi, kemik ve eklem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Vahaboğlu ve Akhan, 2008). Ayrıca, vücudun savunma sisteminin zarar gördüğü, epitel bariyer bütünlüğünün bozulduğu, tıbbi cihazların kullanımı sonucu normal fizyolojik fonksiyonun değiştiği ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli kullanıldığı durumlarda geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahip olabilmektedir (Streeter ve Katouli, 2016). Bunun yanı sıra sağlıklı bireylerde nadiren de olsa kolonize olabilmektedir (Moradali ve ark., 2017).

4.1.3. *P. aeruginosa*'nın genetik özellikleri ve yüksek riskli klonlar

P. aeruginosa, 5,2 ila 7 milyon arasında değişen baz çifti içeren büyük tek bir kromozoma sahiptir. Genomu yaklaşık %66 oranında GC baz çiftinden oluşmaktadır. (Shen ve ark., 2018).

İlk kez 1950'lerde Avustralyalı bir hastanın yarısından izole edilen PAO1 suşunun genom dizilimi yapılarak *P. aeruginosa*'nın genom yapısının; çekirdek (core) genom, aksesuar genom ve pan genom yapılarından oluştuğu tespit edilmiştir. PAO1 toplam genomun %90'ını oluşturmaktadır. Dışa atım pompaları ve beta-laktamaz üretimi gibi intrinsik özellikler çekirdek genomda, kazanılmış antibiyotik direnç genleri ise aksesuar genom bulunmaktadır. Çekirdek genom bölgesindeki mutasyonlar ve farklı suşlar arasındaki genetik çeşitlilik sınırlıdır. Aksesuar genomda ise virülans genlerini kodlayan genler bulunur ve bakteriyofajlardan, transpozonlardan ya da diğer suş ve türlerden plazmidlerin entegrasyonu ile çeşitli değişiklikleri barındırabilmektedir (De Sousa ve ark., 2021; Streeter ve Katouli, 2016; Grosso-Becerra ve ark., 2014).

P. aeruginosa, PAO1 dizilimine dayanan verilere göre *Escherichia coli* (4,72 Mbp) ve *S. aureus* (2,8 Mbp) gibi diğer yaygın nazokomiyal enfeksiyon etkenlerinden daha büyük genoma (6,3Mbp) sahiptir. Bu sayede, farklı ortamlarda ve habitatlara uyum sağlamasına izin veren metabolik yollar ve fizyolojik tepkiler geliştirebilmektedir (Stover ve ark., 2000; Fredens ve ark., 2019; Liao ve ark., 2019).

P. aeruginosa'da başlıca üç yüksek riskli klon bulunmaktadır. ST235 klonu beş kıtanın tamamında bulunan en yaygın klondur. ST111 dünya çapında, ST175 Avrupa ülkelerinin birçoğunda yaygın olarak bulunmaktadır. ST235 ve ST111 klonlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve metallo-beta-laktamazlar (MBL) yaygın olarak görülmektedir (Horcajada ve ark., 2019; Oliver ve ark., 2015).

4.1.4. *P. aeruginosa*'da antimikrobiyal direnç ve mekanizmaları

P. aeruginosa'nın mevcut antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirebilme yetenekleri ve tedavi süresinde aşırı antibiyotik kullanımı enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorun haline gelmiştir (Lister ve ark., 2009; Hirsch ve Tam, 2010). *P. aeruginosa* suşları uluslararası terminolojiye göre, üç veya daha fazla antimikrobiyal sınıfta en az bir ajana duyarlı olmayarak çok ilaca dirençli (MDR), iki veya daha az sayıda antimikrobiyal sınıftaki en az bir ajana duyarlı olarak ilaçların çoğuna dirençli (XDR) veya tüm ilaçlara dirençli (PDR) olabilmektedir (El Zowalaty ve ark. 2015). Beta-laktamlar ve beta-laktamaz inhibitörlerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte terminolojiye yeni bir terim dahil olmuştur. Bazı geleneksel antibiyotik/antibiyotik kombinasyonlarına (piperasilin-tazobaktam, aztreonam, meropenem, imipenem/silastatin, levofloksasin vb.) dirençli ancak yeni geliştirilen beta-laktamlar ve beta-laktamaz inhibitörleri kombinasyonlarına ve kolistine duyarlı olan izolatlarla tedavisi zor dirençli (DTR) *P. aeruginosa* tanımı yapılmıştır (Losito ve ark., 2022).

P. aeruginosa'da antibiyotiklere karşı intrinsik, kazanılmış ve adaptif olmak üzere çeşitli antimikrobiyal direnç mekanizmaları rol almaktadır. Dirençli suşlarda aynı anda farklı mekanizmalar birlikte görülebilmektedir (Behzadi ve ark., 2021).

İntrinsik direnç, bakterinin yapısal veya fonksiyonel özellikleriyle antibiyotiklerin etki mekanizmalarına karşı doğal bir savunma mekanizması geliştirme yeteneğidir. *P. aeruginosa* genetik olarak yüksek doğal antibiyotik direncine sahiptir. Dış membran geçirgenliğinin azalması, MDR dışa atım pompalarının ekspresyonu ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretilmesi gibi birçok intrinsik direnç mekanizması bulunmaktadır (Cox ve Wright, 2013).

Dış zarın azaltılmış geçirgenliği ve dışa atım pompaları *P. aeruginosa*'da görülen antibiyotik direncinin başlıca sebeplerindendir. *P. aeruginosa*'nın doğal dirençli olduğu antibiyotikler; glikopeptid antibiyotikler, daptomisin, linezolid, makrolidler, klindamisin, streptograminler, rifampin, trimetoprim sulfametoksazol, tetrasiklin, aminopenisilinler ve bunların beta-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonların, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, sefotaksim ve

seftriaksondur. Duyarlı olduğu antibiyotikler ise aztreonam, üreidopenisilinler, karboksipenisilinler, bazı 3. kuşak sefalosporinler, tüm 4. kuşak sefalosporinler, karbapenemler dir (meropenem ve imipenem) (Behzadi ve ark., 2021).

Kazanılmış direnç, bakterinin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkmaktadır. İki ana mekanizma ile gerçekleşir: kromozomal genetik mutasyonlar ve genetik elementlerin (plazmidler, transpozonlar, integronlar vb.) horizontal transferi. Kromozomal genetik mutasyonlar, bakterilerin kromozomlarındaki genetik materyallerinde mutasyonların meydana gelmesi sonucu antibiyotiklerin hedefi olan proteinlerin değişmesi ile gerçekleşmektedir. Genetik elementlerin horizontal transferi, bakteriler arasında genetik materyalin doğrudan aktarılması sürecidir ve transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon ile gerçekleşmektedir. *P. aeruginosa*'da Operon D (OprD) geninde gelişen mutasyonlar sonucu karbapenemlere direncin gelişmesi kazanılmış direncin örneklerinden biridir. *P. aeruginosa*'da bir başka kazanılmış direnç örneği, AmpC gen mutasyonu sonucu AmpC'nin aşırı ekspresyonu beta-laktamazların aşırı üretimi ile sonuçlanır ve bu durumda sefalosporinlere karşı yüksek direnç oranı görölmektedir. Çalışmalarda GSBL'ler, karbapenemazlar, aminoglikozid modifiye edici enzimler ve 16S rRNA metilazlar için horizontal gen transferi yoluyla *P. aeruginosa*'da direnç geliştiği bildirilmiştir (Behzadi ve ark., 2021; De Sousa ve ark., 2021; Moradali ve ark., 2017).

Adaptif direnç, bir bakterinin çevresel koşullara ve dış uyaranlara uyum sağlamak için hücrenel düzenleyici mekanizmaları tetikleyerek gelişmektedir. Bu direnç, spesifik çevresel stres faktörleri veya belirli antibiyotiklerin varlığı tarafından indüklenebilmektedir. Adaptif direnç genellikle geçici bir durumdur. Dış uyaranlar ortadan kaldırıldığında veya antibiyotik etkisi sona erdiğinde, bakterinin adaptif direnci kademeli olarak kaybolur. Bu durumda, bakteri yeniden çevresel koşullara veya antibiyotiklere duyarlı hale gelir. *P. aeruginosa* biyofilm oluşturarak ve lipopolisakkaritin yapısal değişikliğini sağlayarak adaptif direnç geliştirebilmektedir (De Sousa ve ark., 2021).

4.1.4.1. Antibakteriyellerin etki mekanizması

Antibiyotik tedavisinin temeli Paul Ehrlich'in 20. yüzyılda yaptığı çalışmalara dayanmaktadır. Alexander Fleming bu çalışmalardan ilham alarak 1928 yılında ilk antibiyotik olan penisilini keşfetmiştir. Bu büyük gelişme tıbbi ve bilimsel alanlarda devrim niteliğinde etki yaratmıştır. Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde, bakteri hücresinin üremesini durdurarak

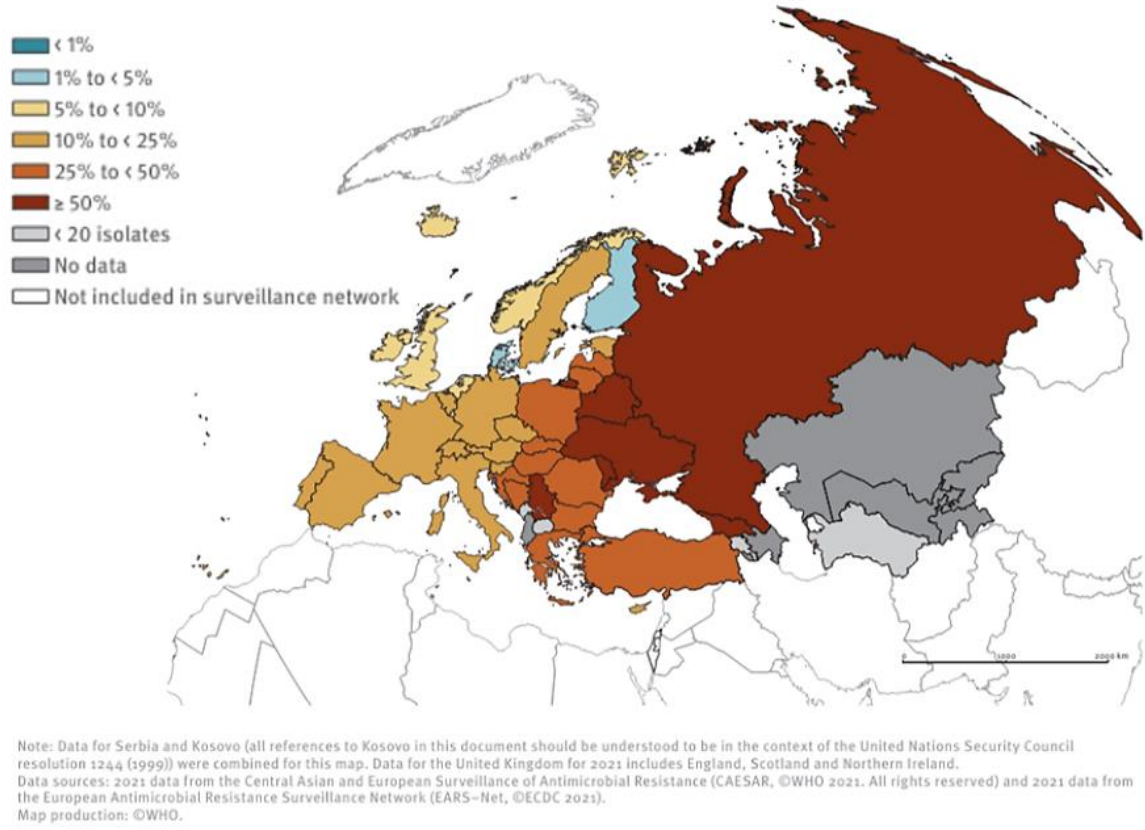
(bakteriyostatik) ya da bakteri hücrelerini öldürerek (bakterisidal) etki gösteren antibiyotikler veya antibakteriyel ilaçlar kullanılır. Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre; hücre duvar sentezini inhibe edenler, protein sentezini inhibe edenler, folik asit sentezini engelleyenler, nükleik asit sentezini engelleyenler ve hücre zarı yapısını bozanlar olarak sınıflandırılmıştır. (Murray ve ark. 2007)

Beta-laktam antibiyotikler; bakterilerin hücre duvarı sentezini engelleyen, geniş etki spektrumuna sahip günümüzde en sık kullanılan başlıca antibiyotik gruplarından biridir. 70 yılı aşkın bir süredir bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Bush ve ark., 2016). Bu gruptaki antibiyotikler moleküler yapısında biri azot, üçü karbon olan dört üyeli ortak bir beta-laktam halkasına sahiptir. Beta-laktam halkası, bakteriyel hücre duvarının sentezinde önemli bir rol oynayan karboksipeptidaz ve transpeptidazları hedef alarak antibakteriyel etki göstermektedir. Bu gruba penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta-laktam inhibitörleri dahil olmaktadır (Vahaboğlu ve Akhan 2008; Murray ve ark., 2007; Brooks ve ark., 2013).

4.1.4.2. Karbapenemler ve karbapenemlere karşı gelişen direnç

Karbapenemler, beta-laktam antibiyotik grubu içinde yer alan en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Toprakta yaşayan *Streptomyces cattleya* adlı organizmanın ürettiği doğal bir antibiyotik olan tienamisin türevleridir. Bakteri hücresinin dış membran proteinleri aracılığıyla periplazmik alana girip penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterilerde bakterisidal etki göstermektedir. Genel yapıları ve boyutları nedeniyle porin kanallarından geçmede ve bakteri hücrelerine nüfuz etmede oldukça başarılıdır. Karbapenemlerin çok sayıda farklı PBP'ye bağlanabilmesi etkinliğinin yüksek olmasını sağlayan faktörlerden biridir. Bununla birlikte beta-laktamaza dirençli olduğu için MDR gram negatif bakteri enfeksiyonlarında sıkça kullanılmaktadır (Yao ve Moellering, 2009; Bush ve ark., 2016).

Son yıllarda, dünya genelinde karbapenemlere karşı direncin artması dikkat çekici bir durumdur (Buehrle ve ark., 2016). Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (ECDC) 2023 yılında yayınlanan sürveyans raporuna verilerine göre dünya genelinde *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç oranının %18,1, Türkiye'de ise %39 olduğu bildirilmiştir (ECDC, 2023) (Şekil 1).



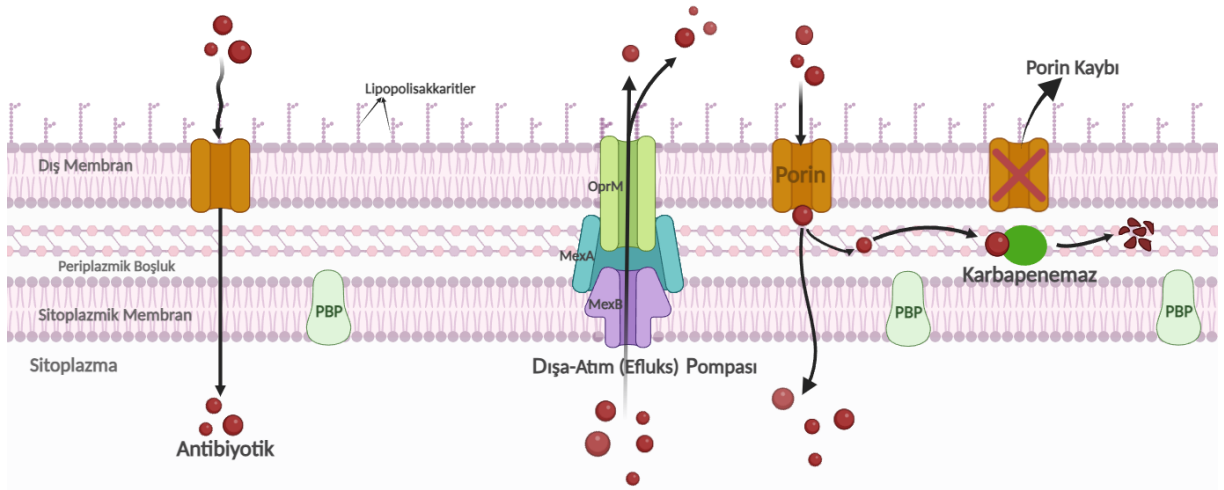
Şekil 1. ECDC 2021 verilerine göre ülkelere göre karbapenemlere (imipenem/meropenem) dirençli invaziv *P. aeruginosa* izolatların yüzdesi (ECDC, 2023)

Birçok ülkenin antibiyotik direnç sonuçlarının bulunduğu 2017 DSÖ raporuna göre, karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın 25 kazanılmış direnç paternini taşıyan 20 bakteri türü içerisinde ikinci sırada yer alan kritik öncelikli bakteri olarak bildirilmiştir (Tacconelli ve ark. 2018).

Karbapenem grubunda meropenem, imipenem, ertapenem ve doripenem yer almaktadır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında meropenem, doripenem ve imipenem etkilidir (Riera ve ark. 2011). Ertapenem, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilmemektedir (Codjoe ve Donkor, 2017).

P. aeruginosa'da karbapenem direnci üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir (Tamma ve Simner, 2018) (Şekil 2):

1. Dış membran porin defekti
2. Dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu
3. Karbapenemazlar



Şekil 2. Karbapenem direnç mekanizmaları

4.1.4.2.1. Dış membran porin defekti

Bakterilerin dış zarları, antibiyotiklerin içeri girmesini zorlaştıran koruyucu bir bariyerdir. Bu bariyerde antibiyotiklerin ve birçok hidrofilik maddenin geçişini sağlayan porin proteinlerini bulunmaktadır. Porin ekspresyonunun modifikasyonu veya porin kodlayan gendeki değişiklikler sonucu dış zarda meydana gelen porin kaybı özellikle karbapenem grubu antibiyotiklerin PBP'lerin bulunduğu periplazmik boşluğa girişini engelleyebilmektedir.

P. aeruginosa izolatlarında, karbapenemlerin hedeflediği başlıca protein olan OprD porin proteini kodlayan genin azalmış regülasyonu, karbapenemlere karşı direncinin esas mekanizmalarından biridir. Fakat porin kaybının tek başına yüksek düzey karbapenem direncine neden olduğu durumlar sınırlıdır (Strateva ve ark., 2009). OprD porin kaybı bakterinin imipenem ve meropenem duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır. Genellikle dirençli suşlarda porin kaybı ile aktif pompa sistemleri veya beta-laktamazın aşırı üretimi gibi ikinci bir direnç mekanizması da bulunmaktadır (Poole, 2011).

4.1.4.2.2. Dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu

Dışa atım pompaları, bakteri hücresinin içinde birikmiş olan çeşitli zararlı ajanları, özellikle antibiyotikleri ve diğer toksik bileşikleri hücre dışına atmak için kullanılan, çoklu ilaç direncini etkileyen protein yapılarıdır. *P. aeruginosa*'daki dışa atım pompası çoğunlukla çoklu ilaç akış sistemleri olan dirençli nodülasyon bölümü (RND) ailesine aittir (Daury ve ark., 2016).

P. aeruginosa'nın direnç geliştirmesinde MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN dışa atım pompaları rol oynamaktadır. MexAB-OprM, beta-laktam ve kinolonların bakteri dışına

atılımını sağlayarak antibiyotik direncinde önemli etkiye sahiptir (Braz ve ark., 2016; Tian ve ark., 2016; Li ve ark., 2021) MexAB-OprM, *P. aeruginosa*'nın intrinsik direncinde önemliyken, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN intrinsik direnci etkilememektedir. MexEF-OprN'nin artan ekspresyonu OprD proteinlerinde azalmaya neden olmaktadır. Bu bağlamda MexEF-OprN karbapenem direncinden kritik öneme sahiptir ve imipeneme dirençle karakterizedir (Glen ve Lamont, 2021). Ek olarak, PBP'lerdeki (PBP2, PBP3) mutasyonlar da karbapenemlere dirençle ilişkilendirilmektedir (Vázquez-Ucha ve ark., 2020).

4.1.4.2.3. Karbapenemazlar

Karbapenemazlar, diğer karbapenem direnç mekanizmalarından farklı olarak genellikle plazmidler aracılığıyla hızla yayılabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, karbapenemaz üretimi ile gelişen direnç dikkat çekicidir. Karbapenemazlar, inhibitör profilleri ve enzim substratları hidrolizine göre yapılan Ambler sınıflandırmasına göre A, B, C ve D olmak üzere dört farklı sınıfa ayrılır. Sınıf A, C ve D karbapenemazların aktif bölgelerinde serin bulunmaktadır. Sınıf B karbapenemazlarda ise çinko enzimi bulunduğu için metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak da isimlendirilmektedir. Ambler sınıflandırmasının yanı sıra aminoasit özellikleri esas alınarak yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre karbapenemazlar grup 2df, 2d ve 3'te bulunmaktadır (Ambler, 1980; Nordmann ve ark. 2009) (Tablo 3).

Tablo 3. Karbapenemazların sınıflandırılması (Karaaslan ve Soysal 2017'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Fonksiyonel Mekanizma	Sınıflandırma		Enzim	Gen Yerleşimi
	Ambler	Bush Jacoby		
Serin	Sınıf A	2f	SME-1, SME-2, SME-3	Kromozom Kökenli
			İMİ-1	Kromozom Kökenli
			KPC-1, KPC-2, KPC-3, KPC-4	Plazmid
Metallo (Çinko)	Sınıf B	3	GES-2, GES-4, GES-5, GES-6	Plazmid
			İMP	Plazmid
			VİM	Plazmid
Serin	Sınıf D	2df	NDM	Plazmid
			OXA-51	Kromozom Kökenli
			OXA-23, OXA-48,	Plazmid

Sınıf A karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemaz grubunda, plazmidler aracılığıyla kodlanan *Klebsiella pneumoniae* Karbapenemazı (KPC) ve Guiana Extended Spectrum (GES); genellikle kromozomal olarak kodlanan Non-Metalloenzim Karbapenemaz (NMC), İmipenem Hidrolize Edici Beta-Laktamaz (İMİ) ve *Serratia marcescens* Enzimi (SME) bulunmaktadır (Xia ve Tang, 2016).

NCM, İMİ ve SME enzimleri bakterilerin kromozomlarındaki genetik materyalde kodlandığı için diğer karbapenemazlara göre daha az yaygındır ve dünya çapında nadir olarak rapor edilmektedir (Diene ve Rolain, 2014).

KPC ve GES enzimleri aktarılabılır plazmidlerde bulunmaktadır. KPC, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de yaygın olarak; GES ise esas olarak *P. aeruginosa*'da, daha az olarak *K. pneumoniae* izolatlarında görülmektedir (Bush ve Bradford, 2020).

Sınıf B metallo-beta-laktamazlar

Sınıf B grubunda Verona Integron-Encoded MBL (VİM), New Delhi MBL (NDM), Sao Paulo MBL (SPM), Seul İmipenemase (SİM), Adelaide İmipenemase (AİM) ve German İmipenemase (GİM) sınıfı bulunmaktadır (Hong ve ark., 2015). MBL'ler etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile inhibisyona uğrarlar. MBL genleri; integron, transpozon, plazmid veya kromozom üzerinde bulunabilir. *P. aeruginosa* da dahil olmak üzere birçok bakteri türlerinde tanımlanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarında saptanan karbapenemazların büyük çoğunluğu bu sınıfta bulunan karbapenemazlardır. *P. aeruginosa*'da en yaygın görülenler NDM, VİM ve İMP 'dir (Sawa ve Moriyama, 2020).

Sınıf D oksasilinazlar

Sınıf D karbapenemazlar, oksasilini hidrolize ettikleri için OXA-tip karbapenemazlar olarak tanınmaktadır. Klavulanik asit ve EDTA ile düşük düzeyde inhibisyon sergilerler. OXA tipi karbapenemazların çoğu, imipenem ve özellikle meropenem karşı düşük hidrolitik aktivite sergiler. *P. aeruginosa* suşlarında OXA-40, OXA-48, OXA-181 ve OXA-198 gibi oksasilinaz üreten suşlar tespit edilmiştir. Sınıf D karbapenemazlar, farklı coğrafi bölgelerde bulunmalarına rağmen, *P. aeruginosa*'da seyrek olarak karşılaşıldığı bilinmektedir (Budak ve ark., 2012).

Kromozomlardan doğrudan kodlanan OXA-51 ve plazmidler aracılığıyla aktarılan OXA-23, OXA-48 ve OXA-58 gibi karbapenemazlar, sınıf D karbapenemazların en bilinen örnekleridir (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006).

4.2. Tedavi, Korunma ve Kontrol

P. aeruginosa'da değişik direnç paternlerinin bulunması, dirençli suşların artması ve hastanelerdeki fazla miktarda antibiyotik kullanılması son yıllarda çoklu antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşlarının artmasına başlıca sebeplerindendir. Bu durum pseudomonal enfeksiyonların tedavilerinde sorunlar ortaya çıkarmaktadır (Xu ve ark., 2013).

P. aeruginosa, beta-laktam ajanlara karşı birçok mekanizma kullanarak direnç göstermektedir. Karbapenemler *P. aeruginosa* tedavisinde en güvenilir ajandır. Son yıllarda karbapenemlere karşı gelişen direncin artması endişe vericidir. Karbapenemaz üreterek geliştirilen direnç son yıllarda sık sık rapor edilmektedir. Ayrıca çoklu ilaç direnci olan *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde anti-pseudomonal beta-laktam ile aminoglikozid veya florokinolon kullanmak tedavide etkili olabilmektedir (Xu ve ark., 2013).

P. aeruginosa enfeksiyonlarını tedavisinde; aminoglikozidler, karbapenemler (meropenem, imipenem), bazı 3. kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefepim, sefsulodin, sefaperazon), 4. Kuşak sefalosporinler, kinolonlar, karboksipenisilinler, monobaktamlar (aztreonam), fosfomisin, polimiksinler (kolistin ve polimiksin B) ve tetrasiklinler kullanılabilir (Talaro ve Chess, 2012).

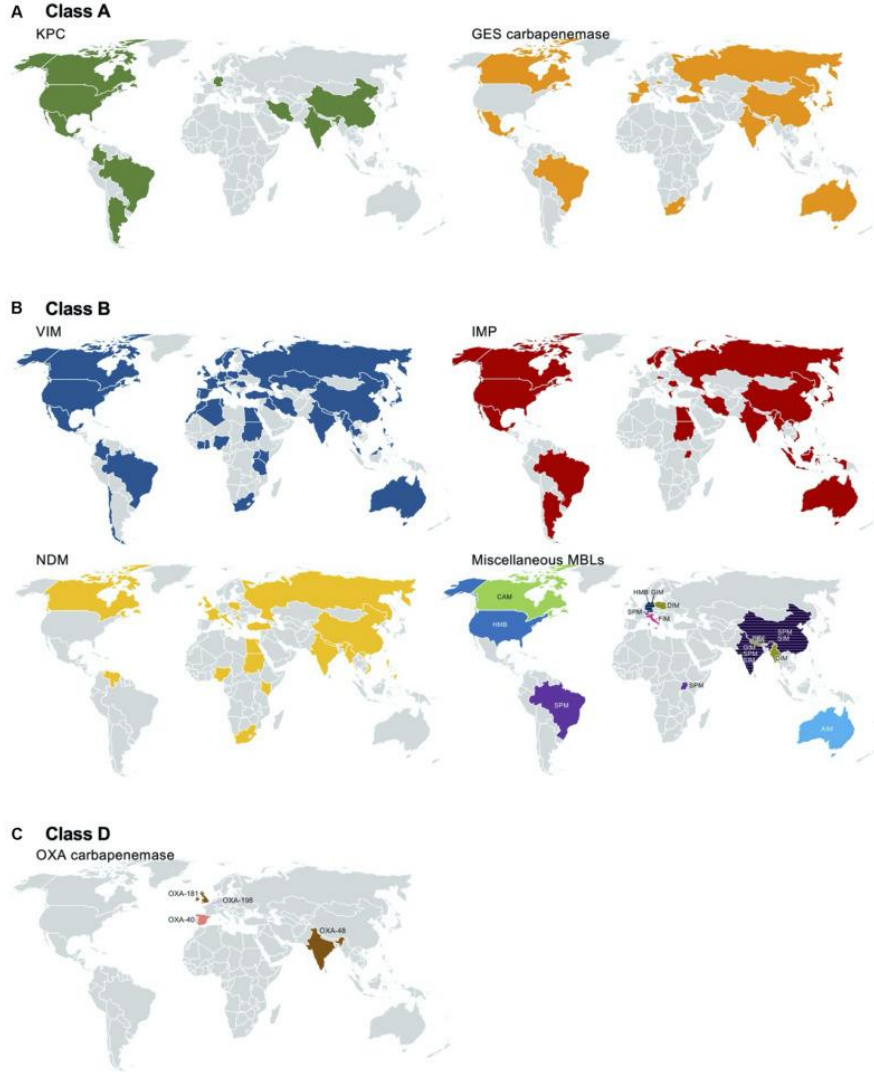
Etkili bir enfeksiyon kontrolü için hasta ve sağlık çalışanı arasındaki çapraz bulaşın önlenmesi en önemli şarttır. Başta solunum ve diyaliz cihazları olmak üzere hastane ekipmanlarının bulaştan korunması gereklidir. Dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının artmaması için gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin son çare olarak kullanılması önerilmektedir (Forbes ve ark., 2002).

4.3. Karbapenem Direncinde Karbapenemazların Rolü

Günümüzde *P. aeruginosa* suşlarında dünyanın çeşitli bölgelerinde farklı karbapenemaz tipleri tespit edilmiştir (Şekil 3).

Sınıf A'da bulunan KPC ilk kez 1996 yılında ABD'de *K. pneumoniae* izolatından izole edilmiştir. Daha sonra Asya, Güney Amerika ve Avrupa gibi birçok ülkede tespit edilmiştir. (Nordmann ve ark., 2009, Watanabe ve ark. 1991). ABD'de en sık tespit edilen karbapenemaz KPC'dir. KPC'nin en sık bildirilen varyantları KPC-2 ve KPC-3'tür (Van duin ve ark., 2017). *P. aeruginosa*'da nadir rastlanmaktadır ve Kolombiya, Çin ve ABD'de tespit edilmiştir (Potron

ve ark., 2015). GES ilk kez 1998 yılında Fransa’da *K. pneumoniae*’den izole edilmiştir. *P. aeruginosa*’da tanımlanan ilk GES tipi Güney Afrika’da bir hastane salgınında tespit edilen GES-2’dir. GES-5 varyantı Avrupa ülkelerinden rapor edilmiştir (Walther-Rasmussen ve Hoiby, 2007; Queenan ve ark., 2007).



Şekil 3. Karbapenemaz üreten *P. aeruginosa*'nın dünyadaki dağılımı (Yoon ve ark., 2021)

Sınıf B MBL’ler ise ilk kez 1991 yılında Japonya’da izole edilmiş daha sonra diğer Uzak Doğu ülkelerinde, Avrupa’daki ülkelerin büyük bir kısmında ve ABD’den bildirilmiştir. (Nordmann ve ark., 2009, Watanabe ve ark., 1991). *P. aeruginosa*’da dünya çapında en sık görülen VİM; İMP ise en yaygın ikinci karbapenemazdır. SPM ve VİM Amerika’da en yaygın görülen karbapenemazlardır (Yoon ve ark., 2021).

NDM-1 ilk kez 2009 yılında Hindistan'da *K. pneumoniae*'dan; İMP tipi MBL ilk olarak 1988 yılında Japonya'da GN17203 *P. aeruginosa* suşundan; VİM ilk kez 1999 yılında İtalya'nın Verona şehrinden tespit edilmiştir (Alp ve ark., 2013; Poirel ve ark.,2012; Walsh ve ark., 2005). VİM ve İMP Yunanistan, Japonya ve Tayvan'da endemik olarak bulunmaktadır. VİM-4 Yunanistan'da ve VİM-5 ise ilk defa Türkiye'de *P. aeruginosa* izolatlarında bulunmuştur. Ülkemizde *P. aeruginosa* kökenlerinde İMP-1, VİM-2, VİM-5 VE VİM-38 bildirilmiştir (Kılıç ve ark., 2016; Poirel ve ark., 2015; Yoon ve ark., 2021; Walsh ve ark., 2005; Bahar ve ark., 2004).

MBL direnci, Japonya'dan sonra Çin, Hindistan, Tayvan, Singapur, Kore, İtalya, Fransa, Yunanistan, Avustralya, Almanya, Avusturya, Türkiye, Bulgaristan, Hollanda, İspanya, Meksika, Kolombiya ve ABD gibi çeşitli ülkelerde bildirilmiştir (Cornaglia ve ark., 2011).

P. aeruginosa'da SPM-1 üreten izolat ilk kez 2001 yılında Brezilya'da; SİM üreten Çin'de, GİM 2002 yılında Almanya'da ve AIM üreten Avusturya'da saptanmıştır. (Yoon ve ark., 2021;

Sınıf D OXA tipi beta-laktamazlar ilk olarak Avrupa için sorun oluştursa da günümüzde Asya, ABD ve Avustralya'da birçok ülkede tespit edilmektedir. OXA-48 İlk kez 2001 yılında Türkiye'deki karbapenem dirençli bir *K. pneumoniae* izolatından tanımlanmıştır. OXA-48 ülkemizde *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık rastlanan karbapenemazdır *P. aeruginosa* suşlarında diğer OXA tiplerinden; İspanya'da OXA-40, Hindistan'da OXA-48, Birleşik Krallık'ta OXA-181 ve Belçika'da OXA-198 tespit edilmiştir (Poirel ve ark., 2004; Walther-Rasmussen ve Hoiby, 2007).

4.4. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Yöntemler

Karbapenemaz enzimlerinin çeşitliliği ve farklı tespit yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerindeki değişkenlikler, bu enzimlerin tespitini zorlaştırmaktadır. Karbapenemaz tespit yönteminin seçimi; epidemiyolojik durum, tanısal performans, iş gücü gereksinimi, sonuç alma süresi, yöntemlerin karmaşıklığı ve maliyet gibi faktörlere bağlı olarak yapılmaktadır. Karbapenemaz üretimine bağlı karbapenem direncinin tespiti, hasta yönetimi, enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Bonomo ve ark., 2018). Karbapenemaz tespitinde kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki ana başlığa ayrılmaktadır.

4.4.1. Karbapenemazların tanısında kullanılan fenotipik testler

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz enzimi taşıyan bakterilerin fenotipik yöntemlerle tanımlanmasında; karbapenem ile inhibitör arasındaki sinerji temelli testler, karbapenem hidrolizine dayalı testler ve lateral akım yöntemleri kullanılabilir. Bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları saptanan enzime göre değişmektedir. Bununla birlikte karbapenemaz tarama yöntemi olarak kültür bazlı metotlar (CHROMagar-KPC ve ChromID CARBA gibi kromojenik besiyerleri ve kromojenik olmayan besiyerleri) de kullanılabilir (Aguirre-Quiñonero ve ark., 2017; Osei ve ark., 2015).

4.4.1.1. Karbapenem ile inhibitörler arasındaki sinerji temelli testler

Gradyent E-test: E-Test stribininin bir ucu karbapenem, diğer ucu ise karbapenem ve karbapenemaz inhibitör içermektedir. Bir gece inkübasyon sonunda stribin her iki ucundaki inhibisyon değerleri oranlandığında ≥ 8 bir değer elde edilmesi karbapenem üreten bakteri izolatu olarak değerlendirilir (Aguirre-Quiñonero ve ark., 2017).

Kombinasyon Disk Yöntemi: Karbapenemaz üreten suşlarda karbapenem inhibisyon zon çapının karbapenem inhibitörü varlığında genişlemesi esasına dayanan bir yöntemdir. Aynı plak içine 2 adet imipenem diski yerleştirilir. Bir tanesine karbapenemaz inhibitörü eklenir. İnhibitör eklenmiş imipenem diski zon çapı ile imipenem diski zon çapı arasındaki fark ≥ 7 mm olduğu durumda suş karbapenemaz üretici olarak kabul edilmektedir. (Yong ve ark., 2002).

Çift Disk Sinerji Testi: Bu testte karbapenem ve karbapenemaz inhibitörüyle kombine olan diskler belli uzaklıkta olacak şekilde plağa yerleştirilerek sinerjik inhibisyon zonu gözlemlenir. Karbapenem ve karbapenemaz inhibitörü içeren diskler arasındaki inhibisyon zonu inhibitör eklenmiş diske doğru genişliyorsa karbapenem pozitif olarak değerlendirilmektedir (Lee ve ark., 2001).

Karbapenem ile inhibitörler arasındaki sinerji temelli testlerin duyarlılık ve özgüllükleri yüksek, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilmektedir. Fakat, ESBL ve AmpC üreten izolatlarda yanlış pozitif sonuç alınması ve değerlendirmenin zaman alması gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Aguirre-Quiñonero ve ark., 2017; Hammoudi ve ark., 2014; Bialvaei ve ark., 2016). Karbapenemazlara inhibitör temelli yaklaşım Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Karbanemazlara inhibitör temelli yaklaşım

Direnç Mekanizması	Meropenem ile Sinerji				Temosilin direnci
	DPA/EDTA	FBA	DPA + BA	Kloksasilin	
Sınıf A (KPC)	-	+	-	-	Uygulanmaz ¹
Sınıf B (VİM, İMP, NDM)	+	-	-	-	Uygulanmaz ¹
KPC + MBL	D	D	+	-	Uygulanmaz ¹
OXA-48-benzeri	-	-	-	-	+
AmpC + Porin Kaybı	-	+	-	+	Uygulanmaz ¹
GSBL + Porin Kaybı	-	-	-	-	-

*DPA: Dipikolinik asit, EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit, FBA: Fenilboronik asit

‘+’: Sinerjizm var, ‘-’: Sinerjizm yok, D: Değişken

¹Temosilin hiçbir sinerjinin gözlenmediği durumlarda OXA-48 üretimi ile GSBL+ porin kaybının ayırt edilmesinde önerilir.

4.4.1.2. Karbapenem hidrolizine dayanan testler

4.4.1.2.1. Biyokimyasal testler

Biyokimyasal yöntemler, karbapenemaz üreten izolatların daha kısa sürede ve düşük maliyetle saptanması amacıyla geliştirilen kolorimetrik testlerdir. Bu testlerin çalışma prensibi, karbapenemaz aktivitesiyle karbapenemin beta-laktam halkasının *in vitro* hidrolizi sonucu değişen ortam pH ’sının pH indikatörleri (fenol kırmızısı, brom-timol mavisi vb.) kullanılarak renk değişimi ile gösterilmesine dayanır. Kolorimetrik testlerin avantajları düşük maliyetle iki saat içerisinde karbapenem hidrolizi olup olmadığını gösterebilmesidir. Bununla birlikte yeni bir enzim dahi olsa herhangi bir karbapenemaz varlığını saptayabilmektedir. Ancak, OXA-48 üreten mukoid suşlarda duyarlılığı düşük kalabilmektedir (Giske ve ark., 2013).

Ticarileşen bir ürün olan Carba NP (Karbapenemase Nordmann-Poirel) ve Blue Carba NP testleri karbapenemaz üretiminin tespitinde kullanılan başlıca kolorimetrik testlerdir (Giske ve ark., 2013; Nordmann ve ark., 2012). Carba NP testinde fenol kırmızısı indikatörünün kırmızıdan sarıya, Blue Carba NP testinde ise bromtimol mavisinin maviden yeşile dönmesi izolatta karbapenemaz varlığını göstermektedir. Nordmann ve ark. (2012) bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğunu bildirmiştir. GES ve OXA-48 gibi, karbapenemler üzerindeki hidroliz etkisi zayıf olan karbapenemazların varlığında duyarlılığın düşük bulunduğu çalışmalar da mevcuttur. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek amacıyla Carba NP testinin bazı parametreleri değiştirilerek çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir (Bonomo ve ark., 2018; Giske ve ark., 2013; Nordmann ve ark., 2012; Tamma ve ark., 2018).

4.4.1.2.2. Karbapenem inaktivasyon metodu

Karbapenem inaktivasyon metodu (CİM), karbapenemaz varlığını belirleyen basit ve ucuz bir yöntemdir (Tamma ve ark., 2018). İlk defa 2015'te Carba NP testine alternatif olarak geliştirilmiştir. CİM'de, distile su ve karbapenemaz üretimi test edilecek bakteri ile süspansiyon hazırlanır. Bakteri süspansiyonuna meropenem diski eklenir ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübasyona bırakılır. 0,5 McFarland bulanıklığında karbapenem duyarlı *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 suşu MHA üzerine yayılır. İnkübasyon süresi sonunda meropenem diski MHA'ya koyulur ve en az 6 saat inkübe edilir. Meropenem bakteri süspansiyonunda hidrolize olmuşsa diskin etrafında inhibisyon zonu oluşmaz ve test pozitif kabul edilir. Bu durum test edilen bakterinin karbapenemaz ürettiğini gösterir. Bu testin uygulama ve değerlendirmesinin kolaylığı, düşük maliyetli ve ilave ekipman ya da kimyasal maddelere gerek duyulmaması gibi avantajlarının yanı sıra enzim türünün belirlenememesi ve standardize edilememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Van der Zwaluw ve ark., 2015). Testteki sınırlamaları karşılamak ve karbapenem saptama yeteneğini arttırmak için modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCİM) geliştirilmiştir. Bu yöntemde, bakteri süspansiyonu su yerine Triptik Soy Buyyon ile hazırlanıp inkübasyon süresi 2 saatten 4 saate, MHA'daki inkübasyon süresi 18-24 saate çıkarılmıştır. İki testte de karbapenemaz tür tayini yapılamaması sebebiyle CLSI 2018'e EDTA ilaveli karbapenem inaktivasyon metodu (eCİM) eklenmiştir (CLSI, 2018). eCİM, mCİM'de hazırlanan bakteri süspansiyonuna ek olarak EDTA ekli ikinci bakteri süspansiyonu hazırlanıp aynı test prosedürü gerçekleştirilir. Test sonunda iki diskin zon çapları arasındaki fark ≥ 5 mm ise Sınıf B karbapenemaz enziminin varlığı gösterilebilmektedir (Tsai ve ark., 2020).

4.4.1.2.3. Modifiye Hodge testi

Modifiye Hodge testi (MHT), karbapenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland bulanıklığında MHA üzerine inoküle edildikten sonra, ortaya konulan meropenem diski ile yapılan bir testtir. Test edilecek bakteri disk kenarından plak kenarına kadar doğrusal bir şekilde ekilir. $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saatlik inkübasyonun ardından karbapenem diski etrafındaki inhibisyon zonu incelenir. Değerlendirilen suş karbapenemaz üretiyorsa diskin çevresinde yonca yaprağı şeklinde inhibisyon zonu oluşur. (Lee ve ark., 2001). MHT; disk difüzyon testinde kullanılan materyallerin yeterli olması, uygulama pratikliği ve OXA-48 ve KPC gibi çoğu karbapenemaz için kabul edilebilir duyarlılık göstermesi ile avantaj sağlar. Ancak enzim türlerinin ayrımının yapılamaması nedeniyle özgüllüğünün düşük olması, GSBL ve AmpC

üreten suşlarda yalancı pozitif sonuç vermesi, değerlendirilmesinin yorumlanabilir olması ve bir gecelik inkübasyon süresi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Hammoudi ve ark., 2014). Bu nedenlerle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve CLSI tarafından artık kullanımı önerilmemektedir. EUCAST bunun yerine FBA, EDTA, kloksasilin gibi karbapenemaz inhibitörleri ile meropenem sinerjisi varlığının test edildiği ve temosilin inhibisyon zon çapının değerlendirildiği inhibitör tabanlı testleri ya da Carba NP gibi biyokimyasal testleri önermektedir (EUCAST, 2015; Tamma ve ark., 2018).

4.4.1.2.4. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrofotometresi (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS çok sayıda mikroorganizmanın cins ve tür düzeyinde kısa sürede tanımlanmasına ve önemli direnç mekanizmalarına sahip mikroorganizmaların ayırt edilmesine olanak sağlayan yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemdir. Yöntemde kullanılan çelik slaytın üzerine test edilecek suş ile matriks solüsyonu eklenerek kristalize edilir. Slayt cihaza yerleştirilir ve lazer ışınlarına maruz bırakılarak iyonize edilir. İyonların kütle ağırlıklarına göre uçuş zamanı bir dedektör tarafından belirlenir. Elde edilen kütle spektrumu, veri tabanındaki referans spektrumlarla karşılaştırılarak mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasını sağlar (Procop ve ark., 2017).

MALDI-TOF MS ile rutin laboratuvarında çok kısa sürede karbapenem hidrolizi ve karbapenemaz tipinin tespit edilmesi mümkündür. Karbapenem üreten test ajanı ve karbapenem ile 1-4 saat inkübasyonundan sonra kütle spektrumunda karbapenemlere özgü olan piklerdeki kaybolma veya yüksekliğinde azalma gibi değişikliklerin saptanması prensibine dayanmaktadır. Uygulanması oldukça kolaydır ve değerlendirmenin bilgisayar aracılı olması sonuçların değerlendirilmesinde hataları minimize etmektedir (Giske ve ark., 2013; Salam ve ark., 2023; Tamma ve ark., 2018; Bialvaei ve ark., 2016).

4.4.1.3. Lateral akım yöntemleri (İmmünokromatografik yöntemler)

Lateral akım yöntemi, karbapenemaz enzim tiplerine karşı spesifik antikorların kullanıldığı immünokromatografik yöntemdir. Test edilecek örnekte bulunan antijenin kromatografik kâğıda sabitlenmiş antikor ile kompleks oluşmasıyla sonuç bölgesinde görünür bantlar oluşmaktadır. Bu yöntemle karbapenemazların varlığını ve türünü yaklaşık 15 dakika içinde belirlemek mümkündür (Tamma ve ark., 2018). Testin duyarlılık ve özgüllük oranları %95-100

arasındadır. OXA-48, KPC, İMP, VİM ve NDM karbapenemazların hızlı tespiti için ticari olarak geliştirilmiş yöntemler bulunmaktadır (Aguirre-Quiñonero ve ark., 2017).

4.4.2. Karbapenemazların tanısında kullanılan genotipik testler

Genotipik yöntemler karbapenemaz varlığının saptanması ve türlerinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bilinen bütün karbapenemaz genlerinin saptanabiliyor olması, karbapenemaz tiplerinin ayırt edilebilmesi, hızlı sonuç alma süresi, fenotipik yöntemlere göre yüksek duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olması genotipik testlerin avantajları arasındadır. Buna karşın; maliyetinin yüksek olması, özel ekipman ve uzmanlık gerektirmesi rutinde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yöntemler başlıca PZR tabanlı yöntemler, tüm genom dizileme ve hibridizasyon temelli yöntemlerden oluşur (Walsh ve ark., 2005; Al-Zahrani ve ark., 2018; Lee ve ark., 2001).

PZR metodu bu amaçla yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemdir. Yöntemin temeli, çoğaltılması hedeflenen bölgenin iki ucuna spesifik ve bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primerin kullanılmasıyla sınırlandırılmış olan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır. PZR temelli testlerin verimliliğini arttırmak amacıyla tek bir PZR tepkimesinde birden fazla farklı DNA hedefinin amplifikasyonunu sağlayarak zaman ve maliyet tasarrufu sağlayan multiplex PZR geliştirilmiştir. Bununla birlikte floresan boyanın bağlı olduğu DNA probları sayesinde hedef DNA'nın amplifikasyonu floresan sinyaldeki artış ile anlık olarak tespit edilebilen gerçek-zamanlı PZR yöntemi de bulunmaktadır (Osei ve ark., 2015; Bialvaei ve ark., 2016).

2012'de yapılan bir çalışmada, *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında NDM, KPC, GES, İMP, VİM ve OXA-48 gibi direnç genlerini aynı anda tespit edebilen bir multipleks gerçek-zamanlı PZR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, genomik DNA ekstraksiyonunu da dahil olmak üzere 3 saat içinde sonuç almayı sağlamıştır ve %100 duyarlılık ile %100 özgüllük göstermiştir, bu da son derece etkili bir tanı yöntemi olduğunu göstermektedir (Osei ve ark., 2015).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Etik kurul onayı

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (03.02.2023 tarih ve 265 kayıt numarası) onaylanmıştır. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO) tarafından TYL-2023-11039 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

5.1. Gereçler

5.1.1. Besiyerleri

1. MacConkey Agar (Biomerieux, Fransa)
2. Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid/İngiltere)

Hazır toz halinde bulunan MHA besiyerinden firma önerileri doğrultusunda 38 g tartılıp 1000 mL distile suda homojen olarak çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edildikten sonra yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulmuştur. Besiyerleri, EUCAST önerilerine göre 9 cm çapındaki steril petri kaplarına (Fıratmed, Türkiye) yaklaşık 25 mL olacak şekilde dökülmüştür. Besiyerleri kullanılana kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

5.1.2. Standart kökenler

1. *K. pneumoniae* CCUG 56233 (KPC pozitif köken),
2. *E. coli* NCTC 13476 (İMP pozitif köken),
3. *K. pneumoniae* NCTC 13440 (VİM pozitif köken),
4. *K. pneumoniae* NCTC 13443 (NDM-1 pozitif köken),
5. *K. pneumoniae* NCTC 13442 (OXA-48 pozitif köken),
6. *P. aeruginosa* ATCC 27853
7. *E. coli* ATCC 25922

5.1.3. Antibiyotik tozu

1. İmipenem-silastatin toz (Cilapem- İlaç A.Ş., Türkiye)

5.1.4. Kimyasal maddeler

1. Fenol Kırmızısı (Sigma, ABD)
2. HCl (Atabay Kimya, Türkiye)
3. NaOH (Merck, Almanya)
4. Tris HCl (HiMedia Laboratories, Hindistan)
5. ZnSO₄ (Merck, Almanya)

5.1.5. PZR malzemeleri

1. Enjeksiyon suyu (DNaz-RNaz Free Distile su) (Thermo Fisher Scientific, ABD)
2. 1kb DNA Ladder (GeneMark, ABD)
3. 10x TBE Buffer (Tris, EDTA, Borik asit) (Rotiphorese, Almanya)
4. 6 x Loading Dye (SIGMA, ABD)
5. 2x PZR Master mix (Thermo Scientific, ABD)
6. Etidyum bromür (Biofroxx, Almanya)
7. *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* revers ve forward primerleri (Qiagen, Hollanda)
8. Agaroz (IBI Scientific, ABD)
9. 1,5ml, 0,5 ml ve 0,2 ml'lik eppendorflar; mavi, sarı, beyaz pipet uçları (DNaz, RNaz Free) (Greiner)
10. Tek kullanımlık steril özeler (ISOLAB, Almanya)

5.2. Araçlar ve Aygıtlar

1. Etüv (Memmert, Almanya)
2. Blok ısıtıcı (Techne, UK)
3. Pasteur fırını (Electro mag)
4. Otoklav (HIRAYAMA, Japonya)
5. Tek kanallı otomatik pipetler (Axygen, ABD; ISOLAB, Almanya)
6. Balonlar, tüpler, sarı ve mavi pipet uçları, sporlar, kurutma kağıtları
7. Steril eküvyonlar ve steril özeler
8. Steril 50 mL Falcon tüp (Fıratmed, Türkiye)
9. Steril petri kutusu (Fıratmed, Türkiye)
10. (+4°C) Buzdolabı (BOSCH, Almanya)
11. (-20°C) Derin dondurucu (Bosch, Almanya)

12. (-80°C) Derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD)
13. MALDI-TOF MS cihazı (BioMerieux, Fransa)
14. Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
15. Vorteks (Yellowline, ABD)
16. Termal döngü cihazı (BIO-RAD, ABD)
17. Elektforez tankları ve cihazı (BIOCOMdirect, ABD)
18. pH Metre cihazı (İnolab, Türkiye)
19. Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
20. UV görüntüleyici (BIO-RAD, ABD)
21. Santrifüj (Abbot, ABD)

5.3. Yöntemler

Bakterilerin seçimi

Çalışmamızda, son 5 yıla ait (2018 Ocak-2023 Şubat) hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden (kan, idrar, yara, doku, periton, plevra vb.) etken olarak izole edilen, rutin laboratuvar testleriyle tür düzeyinde tanımlaması MALDI-TOF MS (BioMerieux, Fransa) ile yapılmış ve rutin antibiyogram sonuçlarına bakılarak imipenem, meropenem veya doripenemden en az birine dirençli olduğu saptanan 100 *P. aeruginosa* izolatu kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak karbapenem duyarlı olduğu saptanan 20 *P. aeruginosa* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların farklı örneklerinden aynı izolatu saptanması durumunda izolatlardan sadece biri çalışmaya dahil edilmiştir.

EUCAST (Versiyon 13.1, Haziran 2023) standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile doripenem (10 µg), imipenem (10 µg) veya meropenem (10 µg) diskleri kullanılarak test edilen antibiyogram sonuçlarına göre inhibisyon zon çapları ölçümünde doripenem için <22 mm, imipenem için <22 mm ve meropenem için <14 mm dirençli kabul edilmiştir.

5.3.1. Karbapenemaz üretiminin fenotipik tespiti

5.3.1.1. Çözeltilerin hazırlanması

Tris-HCl Solüsyonu (20 mmol/L): 100 mL distile su içerisinde 0,3152 gram Tris-HCl çözülerek hazırlanmıştır.

NaOH Solüsyonu (1N): 4,082 gram NaOH 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

ZnSO₄ Solüsyonu (10 mM): 0,287 gram ZnSO₄ 100 mL distile suda çözülerek elde edilmiştir.

Fenol Kırmızısı Stok Solüsyonu: 0,5 gram fenol kırmızısı, 14,1 mL 0.1 M NaOH ve 20 mL etanol içerisinde çözüldükten sonra, solüsyon enjeksiyonluk su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Fenol Kırmızısı Solüsyonu (%0,5): 2mL Fenol kırmızısı stok solüsyonu ve 16,6 mL distile su karıştırılıp pH 7,8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

5.3.1.2. Bakterileri süspansiyonunun hazırlanması

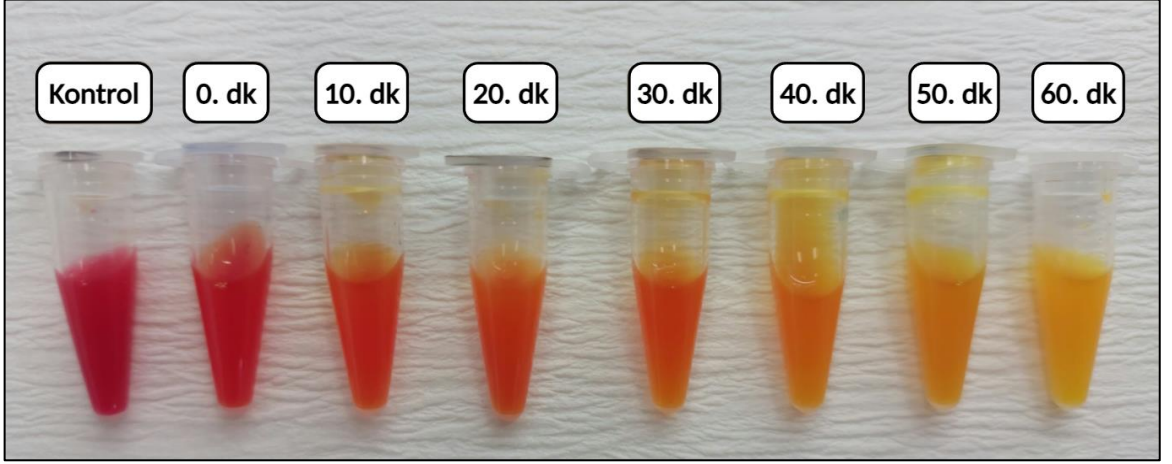
Çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* izolatları -80°C derin dondurucudaki gliserol içeren stok besiyerinden çıkartılarak, aseptik koşullarda MacConkey agara tek koloni ekim tekniği ile pasajları yapıp 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar MacConkey agarda saf olarak üretildikten sonra birkaç koloni alınarak MHA'ya pasajlanmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon ile üretilmiştir. Test edilen izolattan 4 öze (10 µL) dolusu alınarak eppendorf içerisinde 400 µL Tris-HCl (HiMedia, Hindistan) lizis tamponunda (20 mmol/L) süspense edilmiştir. Karışım homojen hale gelene kadar vortekslenmiş (Yellowline), oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik yöntem, Carba NP testinin bir modifikasyonudur. Bu test; *in vitro* ortamda karbapenemazın imipenemi hidroliz etmesiyle ortam pH'ının düşmesi sonucu pH indikatörünün renginin değişmesi prensibine dayanmaktadır. EUCAST; Carba NP testinin yöntem validasyon basamağını MHA, kanlı agar, triptikaz soya agar ve karbapenemaz tarama besiyerlerinin çoğunda üretilmiş koloniler ile yapıldığını ve MacConkey agar plaklarında üretilmiş kolonilerde uygulanmaması gerektiğini bildirmiştir. Bu bağlamda çalışmamızdaki bakterileri canlandırma basamağında, izolatlar MacConkey agara pasajladıktan sonra MHA'a tekrar ekimi yapılmıştır.

5.3.1.3. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yönteminin uygulanması

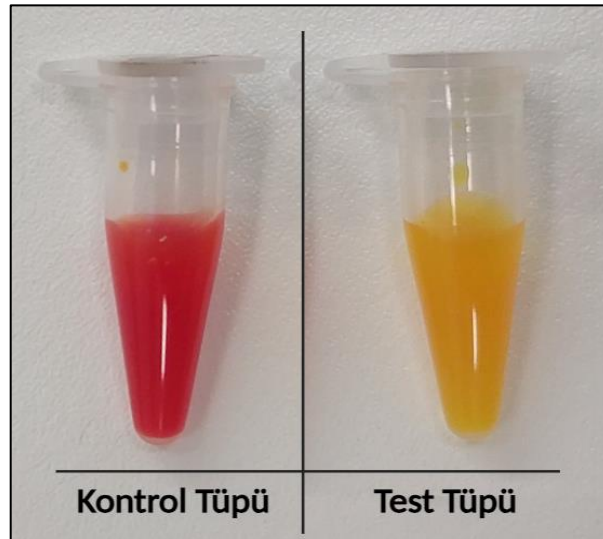
Karbapenemaz üretiminin fenotipik yöntem ile saptanmasında laboratuvarında hazırlanan enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli test kullanılmıştır. Test edilecek her izolat için bir kontrol tüpü (sadece pH indikatörü içeren) ve bir test tüpü (antibiyotik ve pH indikatörü içeren) hazırlanmıştır.

Kontrol tüpü 100 µL fenol kırmızısı (Sigma, ABD) solüsyonu (%0,5, pH 7,8) ve 10 mmol/L ZnSO₄ (Merck, Almanya) çözeltisi içermektedir. Test tüpünde, kontrol tüpü içeriğine ek olarak 6 mg/mL imipenem/silastatin (Tüm Ekip İlaç, Türkiye) eklenmiştir.



Şekil 4. Enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli fenotipik yöntemde pozitif izolat içeren tüpün zamana bağlı değişen görüntüsü

30 µL Bakteri süspansiyonundan kontrol ve test tüplerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Tüpler 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda renk değişimi için değerlendirilmiştir (Şekil 4). İnkübasyon süresi 2 saate uzatılmış sonuçlarda değişiklik olup olmayacağı değerlendirilmiştir. Kontrol tüpünün kırmızı olduğu ve test tüpünde kırmızıdan sarıya belirgin renk değişiminin olduğu durumlar karpabenemaz üretimi lehine değerlendirilmiş ve pozitif sonuç olarak yorumlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Karpabenemaz varlığında Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli testte kontrol tüpü ve test tüpünün görüntüsü

5.3.2. Karbapenemaz üretiminin genotipik (PZR) tespiti

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

DNA izolasyonu

Bakterilerin DNA'sının elde edilmesinde kaynatma yöntemi kullanılmıştır. DNA izolasyonu için, MHA'da üretilen bakteriden birkaç koloni alınmış ve 250 µl steril distile su ile homojenize edilmiştir. Karışım kuru blok ısıtıcıda (Techne, UK) 95°C'de 15 dk tutulmuş ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj (Abbot, ABD) edildikten sonra süpernatant kısmı alınarak PZR için kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklanmıştır.

DNA amplifikasyonu

PZR amplifikasyonları, HiMedia Insta Q96 Plus cihazında uygulanmış olup toplam hacim 25 µl olarak belirlenmiştir. Ambler sınıflandırmasına göre ülkemizde en sık gözlemlenen karbapenemazlar olan sınıf A (KPC, GES), sınıf B (NDM, İMP, VİM) ve sınıf D (OXA-48) karbapenemazları kodlayan *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{İMP}*, *bla_{VİM}*, *bla_{OXA-48}* ve *bla_{GES}* genleri, spesifik primerler ve amplifikasyon koşulları kullanılarak PZR ile tespit edilmiştir. Kullanılan primer dizileri ve protokolleri Tablo 6'da yer almaktadır. Tüm karbapenemaz genleri için aynı PZR karışımları kullanılmıştır. Tablo 5'te açıklanmıştır.

Tablo 5. PZR karışımının içeriği

PZR Bileşenleri	Her Bir Reaksiyondaki Hacim
2X PZR Master Mix (Thermo Scientific, ABD)	12,5 µL
Primer- F	1 µL
Primer-R	1 µL
DNA	2 µL
Steril Su	8,5 µL
Toplam	25 µL

Tablo 6. PZR’de kullanılan primerler ve amplifikasyon koşulları.

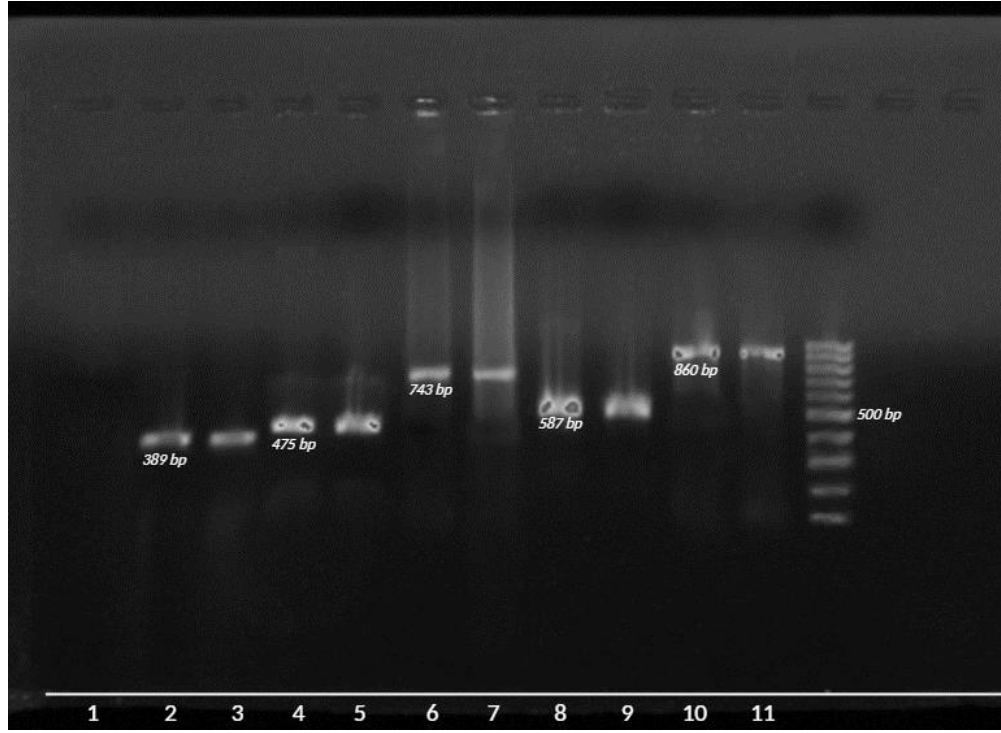
Primer	Dizi	Boyut (bp)	Amplifikasyon Koşulları	Referans
İMP-R	5'-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3'	587	95°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 60 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 8 dk	Pitout ve ark., 2005
İMP-F	5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'			
KPC-R	5'-TCTGGACCGCTGGGAGCTGG-3'	399	95°C 2 dk 35 siklus (94 °C 2 sn, 62 °C 10 sn, 72 °C 15 sn)	Poirel ve ark., 2011
KPC-F	5'-TGCCCGTTGACGCCAATCC-3'			
NDM-R	5'-GGGCAGTCGCTTCCAACGGT-3'	475	95°C 5 dk 30 siklus (95 °C 30 sn, 60 °C 40 sn, 72 °C 50 sn), 72 °C 6 dk	Perry ve ark., 2011
NDM-F	5'-GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT-3'			
OXA-48-R	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'	743	94°C 5 dk 35 siklus (95 °C 1 dk, 56 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 7 dk	Aktaş ve ark., 2008
OXA-48-F	5'-GAGCACTTCTTTTGATGGC-3'			
VİM-R	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	389	95°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 60 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 8 dk	Pitout ve ark., 2005
VİM-F	5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'			
GES-CASA	5'-ACAAAGATTCCATCTCAAGGGAT-3'	860	94°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 56 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 7 dk	Çelik, 2007
GES-CASB	5'-GTTTTAGACGGGCGTCAACT-3'			

Amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezi ile saptanması

Stok TBE tampon solüsyonundan (10x) (Rotiphorese, Almanya) 100 ml alınarak üzerine 900 ml distile su eklenip dilüe edilmiş, 1x TBE tamponu hazırlanmıştır. TBE tamponu agaroz jel hazırlamada ve elektroforez işleminde kullanılmıştır.

Elektroforez için %1’lik agaroz jel hassas terazide 0,5 g agaroz (Merck, Almanya) tartılıp 50 ml 1xTBE tamponunda homojen hale gelene kadar ısıtılarak hazırlanmıştır. Daha sonra üzerine etidyum bromür (0,5 µg/mL) (Biofroxx, Almanya) eklenmiştir. Uygun taraklar elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirildikten sonra agaroz jel, yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde dökülmüş ve katılaşması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilip, tank jelin yüzeyi geçinceye kadar 1x TBE çözeltisi ile doldurulmuştur.

PZR ürünlerinden 5 µl alınarak 1 µl 6xLoading Dye (Sigma, ABD) ile karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklenmiştir. Her uygulamada bir kuyucuğa moleküler belirteç olarak 1 kbp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) yüklenmiştir. Ürünler elektroforez sisteminde 80 voltta 40 dakika yürütülmüştür. Elde edilen DNA bantları, Gel Doc™ EZ System UV transillüminatör görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ABD) ile incelenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{OXA-48}* genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. 1: Negatif kontrol, 2-3: VİM,4-5: NDM, 6-7: OXA-48, 8-9: İMP, 10-11: GES pozitif izolat ve Marker

5.3.3. Verilerin istatistiksel analizi

Verilerin istatistiksel analizi SPSS sürüm 26.0 (IBM, Armonik, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri (PPV) ve negatif prediktif değeri (NPV) altın standart olarak kullanılan PZR testi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İki yöntem arasındaki niteliksel uyum, Phi Cramer's korelasyonu kullanılarak belirlenmiştir. Anlamlılık $P < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

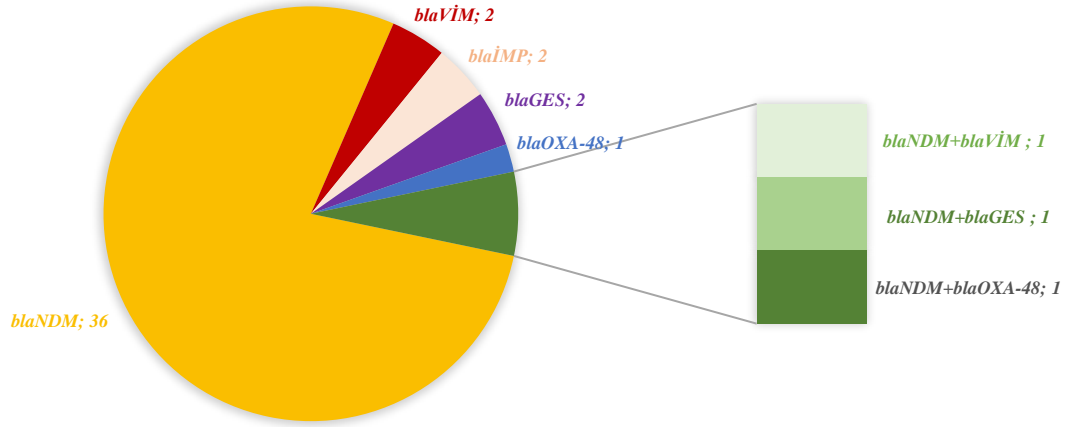
Çalışmamıza dahil edilen karbapenem dirençli 100 *P. aeruginosa* izolatının genotipik test sonuçlarına göre 46'sının (%46) bir veya daha fazla direnç geni taşıdığı, negatif kontrol grubunun test edilen hiçbir karbapenemaz genini taşımadığı tespit edilmiştir. Fenotipik test ile karbapenemaz enzimi taşıyan 46 izolatın 31'i (%67) pozitif saptanmıştır. Geriye kalan 15 izolat yanlış negatif olarak; moleküler yöntem ile araştırılan direnç genlerini taşımadığı belirlenen 2 izolat ise yanlış pozitif şeklinde değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubunun tümünde fenotipik test negatif sonuçlanmıştır (Tablo 7).

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; %93,9 ve %82,8 olarak hesaplanmıştır. Testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %67,4 ve %97,3 ($p < 0,0001$) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizi sonucunda fenotipik test ile PZR testi arasında çok güçlü anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Phi Cramer's $p = 0,704$, $p < 0,001$) (Tablo 7).

Tablo 7. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin sonuçlarının PZR sonucu ile karşılaştırılması

		PZR Sonucu						p değeri
		Negatif	Pozitif	Duyarlılık %	Özgüllük %	PPD %	NPD %	
Enzim-Substrat Etkileşimine Dayalı Reaksiyon Temelli Yöntem	Negatif	72	15	67,4	97,3	93,9	82,8	<0,001
	Pozitif	2	31					

46 izolatta genlerin dağılımı, *bla_{NDM-1}* (n=36), *bla_{GES}* (n=2), *bla_{VIM}* (n=2), *bla_{IMP}* (n=2), *bla_{OXA-48}* (n=1), *bla_{VIM}* ile *bla_{NDM}* birlikteliği (n=1), *bla_{GES}* ile *bla_{NDM}* birlikteliği (n=1) ve *bla_{NDM}* ile *bla_{OXA-48}* birlikteliği (n=1) şeklinde saptanmıştır (Şekil 7). Hiçbir izolatta *bla_{KPC}* geni tespit edilmemiştir. Çalışılan *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 7. PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı

Çalışılan *P. aeruginosa* izolatlarının çoğu (40/120) solunum örneklerinden izole edilmiştir (Tablo 8). Karbapenemaz enzimi ürettiği saptanan izolatların katater ucu ile sürüntü (n=16), idrar (n=11) ve solunum örneği (n=10) dahil olmak üzere farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. 120 izolatın %42'si yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan hastalardan gelen örneklerden izole edilmiştir. Karbapenemaz genine sahip örneklerin Genel YBÜ (n=9) ve Anestesi ve Reaminasyon YBÜ(n=5) dahil olmak üzere %50'sinin YBÜ'den gelen örneklerden izole edildiği saptanmıştır.

Tablo 8. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı (n=120)

Klinik Örnek	YBÜ n (%)	YBÜ Dışı n (%)
Solunum yolu	15(12,5)	25(20,8)
İdrar	6(5)	12(10)
Katater ucu	7(5,8)	6(5)
Sürüntü	6(5)	8(6,7)
Kan	4(3,3)	4(3,3)
Diğer steril örnekler	12(10)	15(12,5)
Toplam	50(42)	70(58)

*YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenemaz üretimine ilişkin fenotipik ve genotipik test sonuçları

Stok Numarası / Yılı	Fenotipik Test Sonucu	Genotipik Test Sonucu
69 / 2023	Negatif	(-)
80 / 2023	Negatif	(-)
101 / 2023	Negatif	İMP
117 / 2023	Negatif	(-)
127 / 2023	Pozitif	NDM
140 / 2023	Negatif	(-)
141 / 2023	Negatif	(-)
168 / 2023	Negatif	(-)
178 / 2023	Pozitif	NDM
181 / 2023	Negatif	(-)
362 / 2023	Negatif	(-)
376 / 2023	Pozitif	NDM
36 / 2022	Negatif	(-)
353 / 2022	Negatif	VİM
741 / 2022	Pozitif	NDM
918 / 2022	Negatif	(-)
937 / 2022	Pozitif	NDM
966 / 2022	Pozitif	NDM
1103 / 2022	Negatif	(-)
1237 / 2022	Pozitif	NDM
1270 / 2022	Pozitif	NDM
1274 / 2022	Pozitif	NDM
1336 / 2022	Pozitif	NDM
1346 / 2022	Pozitif	NDM
1757 / 2022	Pozitif	NDM
1849 / 2022	Pozitif	NDM
1978 / 2022	Pozitif	NDM
2229 / 2022	Negatif	(-)
2263 / 2022	Pozitif	NDM
2305 / 2022	Negatif	(-)

Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenemaz üretimine ilişkin fenotipik ve genotipik test sonuçları (Devam)

Stok Numarası / Yılı	Fenotipik Test Sonucu	Genotipik Test Sonucu
216 / 2021	Negatif	(-)
503 / 2021	Negatif	(-)
566 / 2021	Negatif	(-)
663 / 2021	Negatif	(-)
734 / 2021	Negatif	(-)
747 / 2021	Negatif	OXA-48
804 / 2021	Negatif	(-)
865 / 2021	Negatif	(-)
887 / 2021	Negatif	(-)
916 / 2021	Negatif	(-)
947 / 2021	Negatif	(-)
948 / 2021	Pozitif	NDM
1037 / 2021	Negatif	(-)
1047 / 2021	Pozitif	NDM
1059 / 2021	Pozitif	NDM
1168 / 2021	Pozitif	(-)
1241 / 2021	Negatif	(-)
1242 / 2021	Negatif	GES
1326 / 2021	Pozitif	NDM
1358 / 2021	Negatif	(-)
1475 / 2021	Pozitif	NDM
1564 / 2021	Pozitif	NDM
1593 / 2021	Negatif	(-)
1678 / 2021	Negatif	(-)
1732 / 2021	Pozitif	NDM
2 / 2020	Pozitif	NDM
31 / 2020	Pozitif	NDM
47 / 2020	Negatif	(-)
52 / 2020	Negatif	NDM
102 / 2020	Negatif	(-)

Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenemaz üretimine ilişkin fenotipik ve genotipik test sonuçları (Devam)

Stok Numarası / Yılı	Fenotipik Test Sonucu	Genotipik Test Sonucu
107 / 2020	Negatif	GES
121 / 2020	Negatif	(-)
152 / 2020	Negatif	(-)
226 / 2020	Negatif	(-)
305 / 2020	Negatif	(-)
349 / 2020	Pozitif	(-)
438 / 2020	Negatif	NDM
446 / 2020	Negatif	(-)
469 / 2020	Negatif	(-)
744 / 2020	Negatif	NDM-OXA-48
781 / 2020	Negatif	(-)
986 / 2020	Negatif	(-)
1002 / 2020	Negatif	(-)
1130 / 2020	Negatif	(-)
1144 / 2020	Pozitif	NDM-GES
1254 / 2020	Negatif	(-)
1259 / 2020	Negatif	NDM
1268 / 2020	Negatif	NDM
1270 / 2020	Negatif	(-)
574 / 2019	Negatif	NDM
1367 / 2019	Pozitif	NDM
1414 / 2019	Pozitif	NDM
1733 / 2019	Negatif	NDM
95 / 2018	Negatif	(-)
163 / 2018	Negatif	(-)
381 / 2018	Negatif	(-)
477 / 2018	Negatif	(-)
540 / 2018	Negatif	(-)
552 / 2018	Negatif	(-)
843 / 2018	Pozitif	VİM
875 / 2018	Negatif	(-)

Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenemaz üretimine ilişkin fenotipik ve genotipik test sonuçları (Devam)

Stok Numarası / Yılı	Fenotipik Test Sonucu	Genotipik Test Sonucu
1246 / 2018	Pozitif	NDM-VİM
1490 / 2018	Negatif	NDM
1531 / 2018	Pozitif	NDM
1630 / 2018	Negatif	(-)
1682 / 2018	Negatif	(-)
1967 / 2018	Pozitif	İMP
1990 / 2018	Negatif	NDM
2143 / 2018	Negatif	NDM
2216 / 2018	Negatif	(-)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

P. aeruginosa sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonları olan hastalarda en sık izole edilen patojenlerden biridir ve çok sayıda antibiyotiğe karşı doğal dirençlidir (Halat and Moubareck, 2022). Bununla birlikte pseudomal enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kabul edilen karbapenemler de dahil pek çok antibiyotik grubuna karşı direnç kazanması küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zhang ve ark., 2016). Bu durum enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır ve hastaneye yatırılan veya bağışıklık sistemi zayıflamış hastalar arasında morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır (Shaaban ve ark., 2017). DSÖ, *P. aeruginosa*'yı sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlarda ve salgınlarda öncelikli tehdit oluşturan altı mikroorganizmadan biri olarak göstermektedir (Tacconelli ve ark., 2018).

Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa* hastane kaynaklı ve ventilatörle ilişkili pnömoniler, idrar yolu, yanık ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının başlıca nedenlerindedir (Halat and Moubareck, 2022). Ülkemizde en sık karşılaşılan YBÜ enfeksiyon etkenleri arasındadır (Arman, 2006). Çalışmamıza solunum yolu örnekleri (n=40) dahil olmak üzere çeşitli klinik örneklerden ve en sık yoğun bakım ünitelerinden (%57,5) izole edilen karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları dahil edilmiştir. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda da benzer şekilde karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının en sık yoğun bakım ünitelerinden ve sıklıkla solunum yolu örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Mangayarkarasi ve ark., 2018; Malkoçoğlu ve ark., 2017; Duman ve ark., 2012).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin 2022 sürveysans verilerine göre *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç oranının %18,1, Türkiye'de ise %39 olduğu bildirilmiştir (ECDC, 2022).

P. aeruginosa'da karbapenem direncinin gelişmesinde OprD porin kaybı, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz üretimi gibi çok sayıda mekanizma rol oynar (Jean ve ark., 2022). Bu mekanizmalar içinde karbapenemazlar, plazmid ve transpozon gibi mobil genetik elemanlar aracılığıyla çeşitli bakteri klonları arasında hızla aktarılıp yayılabildiğinden kritik önem taşımaktadır (Henry ve ark., 2011). *P. aeruginosa*'da Ambler sınıf A (KPC ve GES tipi beta-laktamazları), sınıf B (İMP, VİM ve NDM gibi farklı metalo-β-laktamazlar) ve sınıf D (OXA-48) gibi çok sayıda karbapenemaz enzimi tanımlanmıştır. Karbapenemazların dağılımı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. *P. auroginosa*'da en sık

görülen ve klinik açıdan en önemli olan Ambler sınıf B'deki karbapenemazlardır. Bu grupta VİM, İMP ve NDM en yaygın olanlardır (Walsh ve ark., 2005). Bunun yanı sıra dünya genelinde; *Pseudomonas* suşlarında KPC, GES ve OXA gibi beta-laktamaz türlerinin varlığının giderek arttığı rapor edilmiştir (Potron ve ark., 2015).

Karbapenemaz üretimine bağlı direnç, dünya çapında *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere karşı direnç geliştirdiği belirtilen vakaların %39'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da ise bu oran %30,6'dır (Rizek ve ark., 2014; Castanheira ve ark., 2014). Çalışmamızda karbapenem dirençli 100 izolattan 46'sının (%46) genotipik yöntemle bir veya daha fazla karbapenemaz geni taşıdığı tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli olan fakat ilişkili bir gen saptanmayan 54 izolatta, direncin temelinde diğer mekanizmaların ya da bu çalışmada araştırılmayan direnç genlerinin olduğu düşünülmektedir. Direnç geni saptanan 46 izolatta genlerin dağılımı, *bla_{NDM-1}* (n=36), *bla_{GES}* (n=2), *bla_{VİM}* (n=2), *bla_{İMP}* (n=2), *bla_{OXA-48}* (n=1), *bla_{VİM}* ile *bla_{NDM}* birlikteliği(n=1), *bla_{GES}* ile *bla_{NDM}* birlikteliği (n=1) ve *bla_{NDM}* ile *bla_{OXA-48}* birlikteliği (n=1) şeklinde saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL bulunma oranının %31,5 ile 72,2 arasında olduğu rapor edilmiştir (Lombardi ve ark. 2002, Carvalho ve ark. 2013, Maltezou 2009).

Çalışmamızda karbapenemaz geni saptanan izolatlardaki MBL oranı %89 bulunmuştur ve en yaygın *bla_{NDM}* (%84) geni taşıdığı belirlenmiştir. Ülkemizde ilk NDM-1 taşıyan suş, Irak'tan allojenik hematopoietik kök hücre nakli için transfer edilen 16 yaşında bir lösemi hastasından izole edilen *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır. 2010 yılında *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında kıtalar arası yayılım göstererek epidemiyeye neden olmuştur. Dünya genelinde 47 ülkeden pozitif olgu bildirim raporu edilmiştir. Araştırmalar, NDM-1 enziminin artan bir şekilde yayılmakta olduğunu ortaya koymaktadır. NDM geninin genellikle türler arası aktarım kapasitesine sahip mobil genetik elemanlar üzerinde yer aldığı belirtilmektedir (Nordmann ve ark., 2011; Hsueh, 2010, Walsh, 2010; Hernández-García ve ark., 2024).

P. aeruginosa'da karbapenem direnci prevalansı pek çok ülkede %10-50 arasında değişmektedir. Son yıllarda karbapenemlere karşı gelişen direncin tüm dünyada giderek artması nedeniyle bu dirençli mikroorganizmada altta yatan mekanizmanın erken saptanmasına yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur (Çopur ve ark., 2021).

Karbapenemaz genlerinin genotipik tekniklerle tespit edilmesi altın standarttır. Fakat bu yöntem yüksek maliyetlidir, uzmanlık ve uygun laboratuvar olanakları gerektirmektedir (Malkoçoğlu ve ark., 2017). Ayrıca bilinmeyen ve yeni direnç genlerinin varlığı tespit edilemeyeceğinden

yanlış negatif sonuç riski bulunmaktadır (Aktaş ve ark., 2017). Karbapenemazların saptanması amacıyla çeşitli fenotipik yöntemler (Modifiye Hodge testi, karbapenem inaktivasyon metodu, immünokromatografik testler, Carba NP testi vb.) geliştirilmiştir. Tüm bu fenotipik testlerin hız, maliyet, duyarlılık ve özgüllükleri yönünden çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. rnek olarak, Cesur ve ark. (2009) yılında yaptıkları bir çalışmada imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL retimi kombinasyon disk yöntemin ile %62, çift disk sinerji testi ile %73, MHT ile %58 olarak bulmuştur. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, meropenem dirençli olan ve MBL reten 68 *P. aeruginosa* izolatında aynı yöntemlerle karbapenem direnci saptama oranları sırasıyla %80, %100 ve %60 olarak tespit edilmiştir (Bulut ve ağlar, 2013).

Dolayısıyla rutin laboratuvarında uygulanabilmesi için karbapenemaz üretimini hızlı tespit eden, basit, güvenilir ve uygun maliyetli yeni testlere ihtiyaç vardır (Osei ve ark., 2015; Aktaş ve ark., 2017). Bu konuda son dönemde, Nordmann ve çalışma arkadaşları tarafından karbapenemazların hızlı ve ucuz tespiti için Carba NP (Karbapenemase Nordmann-Poirel) testi geliştirilmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Nordman ve ark., 2012; Dortet ve ark., 2014). Carba NP, karbapenem grubu ilaçların beta-laktam halkasının enzimatik hidrolizi sonucu pH indikatörünün renk değişikliğine dayanan kolorimetrik bir testtir (Dortet ve ark., 2014). CLSI ve EUCAST kılavuzlarında yer alan Carba-NP testi, yüksek doğruluk oranlarına sahip olması ve 2 saat gibi kısa süre içinde karbapenemaz aktivitesini saptamasıyla diğer fenotipik yöntemlere göre büyük bir avantaj sağlamıştır (CLSI, 2015; EUCAST, 2017). Carba NP testinin, karbapenemaz üreten *Pseudomonas spp.* için %100 spesifik ve %94,4 duyarlı olduğu bildirilmiştir (Nordmann ve Poirel, 2013). Fakat mukoid izolatlarda ve zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren izolatları enzimleri (OXA-48 ve GES) tespit etmede zorlanması gibi dezavantajları vardır. (Tijet ve ark., 2013).

Karbapenemaz reten *P. aeruginosa*'yı tespit etmek için orijinal Carba NP testinin protokollerinin uygulandığı ve testin performansının değerlendirildiği yedi çalışmada 703 *P. aeruginosa* suşu içerisinden 260 (% 37) karbapenemaz üreticisi tespit edilmiştir. Bu suşların KPC, GES, İMP, VİM, NDM, SPM, GİM, AİM ve OXA-48 karbapenemazlarını barındırdığı belirlenmiştir. Orijinal Carba NP testi ile karbapenemaz üreten *P. aeruginosa*'yı tespit etme duyarlılığının %84,61 ile %100 arasında; özgüllüğünün ise %99 ile %100 arasında olduğu belirtilmiştir (AbdelGhani ve ark., 2015; Chong ve ark., 2015; Dortet ve ark., 2012; Heinrichs ve ark., 2015; Poirel ve ark., 2015; Tijet ve ark., 2013; Bouslah, 2020).

Carba NP testinin sınırlamalarının üstesinden gelmek, maliyeti azaltmak ve işlem süresini kısaltmak amacıyla çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir (CLSI, 2015). Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, CLSI'de açıklanan Carba NP testinin laboratuvarında geliştirdiğimiz bir modifikasyonudur. Kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli yöntemde, Carba NP'den farklı olarak bazı değişiklikler yapılmıştır: İnokülüm miktarı arttırılmış ve bakteriler Tris-HCl lizis tamponunda süspanse edilmiştir. Bakteri süspanasyonu santrifüj işlemi yapılmadan homojen hale gelene kadar vortekslenmiş ve test sırasında bütün bakteri lizati kullanılarak, etüv yerine oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon yapılmıştır. Ayrıca enzim substratı olarak, imipenem monohidrat (3 mg/ml) yerine ticari olarak bulunabilen imipenem-silastatin (6 mg/ml) kullanılmıştır (Abdel Ghani ve ark., 2015). Çalışma için 1,5 ml'lik mikrotüpler kullanılmış ve sonuçlar 2 saat yerine 1 saat sonunda değerlendirilmiştir (Dortet ve ark., 2014; Nordmann ve ark., 2012). Bu değişikliklerle testin yüksek maliyetinin azaltılması ve uygulama süresinin kısaltılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda 36 izolatın *bla_{NDM}* ve 3 izolatın çoklu karbapenemaz genleri (*bla_{VIM}* + *bla_{NDM}*, *bla_{GES}* + *bla_{NDM}* ve *bla_{NDM}* + *bla_{OXA-48}*) taşıdığı moleküler yöntemle tespit edilmiştir. Çoklu karbapenemazları taşıyan 25 *P. aeruginosa* izolatında aynı protokoller uygulanarak Modifiye Carba NP testinin değerlendirildiği bir çalışmada, 7 izolatta *bla_{NDM}* direnç geni ve 6 izolatta çoklu karbapenemaz direnç geni (*bla_{NDM}* + *bla_{OXA 48}* benzeri, *bla_{NDM}* + *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* + *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* + *bla_{OXA 48}* benzeri gen) belirlenerek toplam izolat 16 karbapenemaz pozitif saptanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde, hiçbir izolatta *bla_{KPC}* geni saptanmamıştır. Karbapenemaz geni saptanmayan 9 örneğin tamamı fenotipik yöntemlerle dirençli olarak tanımlanmıştır. Modifiye Carba NP testi, NDM üreten izolatlardan yalnızca 3'ünde (%43) ve çoklu karbapenemaz üreten izolatlardan 3'ünde (3/6) doğru sonuç vermiştir. Çalışmamızda çoklu enzim içeren izolatların tamamı (n=3) fenotipik yöntem ile doğru tanımlanmıştır. NDM taşıyan izolatların %75'inde (n=27) fenotipik yöntem ile pozitif sonuç gözlemlenmiş olup bu sonuçlar, çalışmamızda çoklu enzim taşıyan veya NDM üreten izolatların daha iyi tanımlandığını göstermektedir (Rudresh ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda, enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinin hızlı tespiti özellikle vurgulanmaktadır (Nordmann ve ark., 2012; Nordmann 2014). Çalışmamızın önemli sonuçlarından biri; NDM, VİM, İMP, OXA-48 ve GES tipi karbapenemazların fenotipik test kullanılarak 1 saat gibi kısa sürede tespit edilmesidir. İnkübasyon süresi 2 saate kadar uzatılarak sonuçlar tekrar değerlendirilmiş ve test tüplerinde herhangi bir renk değişimi

gözlemlenmemiştir. Kritik hastalarda uygun antibiyotik tedavisinin verilmesindeki 1 saatlik gecikmenin hastanın ölüm riskini %20 artırdığı dikkate alındığında, testin sonuçlanma süresinin 2 saatten 1 saate düşmesi, hastaya zamanında uygun tedaviyi vermek açısından büyük önem taşımaktadır (Kumar ve ark., 2006). Buna ek olarak 3 izolatta testin ilk 20 dakika içinde pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. PZR analizlerinde bu izolatların *bla_{NDM}* geni taşıdığı belirlenmiştir. Negatif kontrol grubundaki tüm izolatlar fenotipik testte de negatif saptanmıştır. Buna karşın PZR ile karbapenemaz geni (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GES}* (n=2), *bla_{NDM}* (n=9) ve *bla_{NDM}+bla_{OXA-48}*) saptanan 15 izolat fenotipik testte yanlış negatif sonuç vermiştir. Benzer bir çalışmada, karbapenemaz üreticisi olduğu saptanan fakat fenotipik test ile negatif sonuçlanan izolatlarda, direnç genlerinin ekspresyonunun hiç olmadığı veya düşük seviyede olduğu için fenotipik yöntem ile karbapenemaz varlığı tespit edilemediği bildirilmiştir (Dortet ve ark., 2014).

Literatürdeki bir çalışmada bakteri inokülüm miktarının artırılmasıyla duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %72,5 ve %69,2'den %80 ve %77,3'e arttığı gösterilmiştir (Tijet ve ark., 2013). Özellikle OXA-48 ve GES enzimi taşıyan izolatlarda bakteri inokülüm miktarının artışıyla duyarlılığın yükseldiği gösterilmiştir (Aguirre-Quiñonero, ve Martínez-Martínez, 2017). Çalışmamızda yanlış negatif sonuç veren izolatlarda bakteri inokülüm miktarı ve substrat düzeyi artırılarak deney tekrar edildiğinde test sonuçlarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ayrıca çalışmamıza dahil edilen izolatların büyük bir çoğunluğu mukoid fenotip gösterdiğinden kolayca süspansiyon edilememiştir. Mukoid izolatlar kullanılan yöntemin en önemli dezavantajlarından biridir. Yanlış negatif sonuçlar, OXA-48 alt tipleri gibi düşük hidrolitik karbapenemaz aktivitesine sahip enzimlerin varlığına ya da mukoid yapıdaki izolatlarla ilişkilendirilebilir (Yusuf ve ark., 2014). Daha önce yapılan çalışmalarda mukoid izolatların yanlış negatif sonuçlara neden olduğu belirtilmiştir (Tijet ve ark., 2013; Tijet ve ark., 2014).

Karbapenemaz aktivitesinin enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test ile tespiti için standart bir protokol bulunmasa da benzer prosedürlerin uygulandığı birçok çalışma yapılmıştır. Farklı çalışmalarda kullanılan testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri %94-100 ve %98-100 aralığında bulunmuştur (Mangayarkarasi ve ark., 2018; Yusuf ve ark., 2014; Dortet ve ark., 2012; Rudresh ve ark., 2017; Chong ve ark., 2015; Simner ve ark., 2017). Çalışmamızda karbapenemaz üretimi için fenotipik testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %67,4 ve %97,3 olarak belirlenmiştir. Duyarlılık oranımız dünya literatüründe verilen oranlardan düşüktür. Öte yandan suşlardaki karbapenemaz enzimlerinin dağılımı ve mukoid

izolatların çokluğu çalışmalar arasındaki farklılıkları açıklayabilir. Bu nedenle geniş çaplı araştırmalarda farklı direnç temeline sahip çeşitli izolatlarla bu yöntemlerin benzer koşullar altında, uygun şekilde uygulanması gerekmektedir. Çalışmamızda kullanılan izolatların büyük çoğunluğu NDM taşıyıcısıdır.

Akhi ve ark. (2016) karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının tespitine yönelik üç fenotipik yöntem ile (modifiye Carba NP, CİM ve MHT) PZR'ın karşılaştırıldığı bir çalışma yayınlamışlardır. Çalışmada, 121 karbapenem dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatında 11 direnç geni araştırılmış ve sadece 35 izolatta *bla_{IMP}* (n=29) ve *bla_{VIM}* (n=6) karbapenemaz genleri saptanmıştır. Kullanılan Modifiye Carba NP testinde çalışmamızdan farklı olarak bakteri lizati elde etmek için %0,02 asetil trimetil amonyum bromür kullanılmıştır. 121 karbapenem dirençli izolatın MHT ile 40'ı (%33), modifiye Carba NP ile 39'u (%32,2) ve CİM ile 35'i (%28,9) pozitif saptanmıştır. MHT, Modifiye Carba NP testi ve CİM'de sırasıyla 10, 4 ve 1 izolatta hatalı pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Ek olarak, CİM (n=1) ile MHT (n=5) yanlış negatif ve CİM ile modifiye Carba NP'de iki izolat yanlış pozitif sonuçlar saptanmıştır. Fenotipik testler içinde MHT, *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz tespiti açısından PZR ile karşılaştırıldığında düşük duyarlılık ve özgüllük değerlerini göstermiştir. Karbapenem dirençli izolatların çoğu mukoid olmasına rağmen CİM ve modifiye Carba NP'nin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %97,7, %98,8 ve %100, %89,7 olduğu saptanmıştır. Bu bağlamda bu testlerin moleküler yöntemle karşılaştırıldığında uygun fiyatlı ve spesifik olduğu sonucuna varılmıştır.

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin en önemli avantajları uygulanmasının kolay olması ve uzmanlık gerektirmemesidir. Rutin laboratuvarında bulunan temel maddeler ve ekipmanlar kullanılarak klinik örneklerden kültürde üreme sonrası kısa sürede suşun karbapenemaz aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.

DSÖ, karbapenemaz aktivitesini saptamada uygun maliyetli testlerin geliştirilmesini önermektedir. Çalışmamızda test başına maliyet yaklaşık 5 TL (0,14 Euro, 26.01.2024) olarak hesaplanmıştır. Benzer bir çalışmada bir izolat için test maliyeti yaklaşık 0,31 euro, farklı bir çalışmada ise test başına maliyet <0,2 dolar olarak belirtilmiştir (Yusuf ve ark., 2014; Rudresh ve ark., 2017).

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin bir diğer avantajı genellikle moleküler yöntemlerle araştırılmayan nadir enzimlerde de dahil olmak üzere tüm karbapenemaz türlerinde sonuç verebilmesidir (Akhi ve ark., 2017; Nordmann, 2017). Buna

karşın, test çıplak gözle subjektif olarak yorumlandığı için küçük renk değişiklikleri yanlış değerlendirmelere veya belirsiz sonuçlara yol açabilmektedir (Simner ve ark., 2018).

DSÖ, 2050 yılına kadar antibiyotik kullanımını sonucu şiddetlenen ilaca dirençli enfeksiyonların yılda 10 milyon insanı öldüreceğini tahmin etmektedir. Sağlık açısından çok endişe verici bu durumun finansal çıkmaza da neden olacağı ve aşırı yoksulluk ile sonuçlanacağını belirtmektedir (de Kraker ve ark., 2016). Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hızlı ve doğru tanımlanması, uygun tedavinin zamanında verilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin başarılı bir şekilde uygulanması açısından çok önemlidir. Diğer fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında, enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, sonucun hızlı elde edilmesi, yüksek özgüllüğü, kolaylıkla uygulanabilmesi ve kısıtlı bütçeye sahip laboratuvarlarda kullanılabilmesi gibi avantajları nedeniyle öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin geliştirilmesi ve performansının değerlendirilmesine yönelik daha fazla sayıda izolat içeren *in vitro* çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

- AbdelGhani, S., Thomson, G. K., Snyder, J. W., & Thomson, K. S. (2015). Comparison of the Carba NP, Modified Carba NP, and Updated Rosco Neo-Rapid Carb Kit Tests for Carbapenemase Detection. *Journal of clinical microbiology*, 53(11), 3539–3542. <https://doi.org/10.1128/JCM.01631-15>
- Aguirre-Quiñonero, A., & Martínez-Martínez, L. (2017). Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.09.008>
- Akhi, M. T., Khalili, Y., Ghotaslou, R., Kafil, H. S., Yousefi, S., Nagili, B., & Goli, H. R. (2017). Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 29(3), 144–149. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1199506>
- Aktaş, E., Malkoçoğlu, G., Otlu, B., Çopur Çiçek, A., Külah, C., Cömert, F., Sandallı, C., Gürsoy, N. C., Erdemir, D., & Bulut, M. E. (2017). Evaluation of the Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Comparison with the RAPIDEC CARBA NP. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(4), 457–461. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0092>
- Aktaş, Z., Kayacan, C. B., Schneider, I., Can, B., Midilli, K., & Bauernfeind, A. (2008). Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*, 54(2), 101–106. <https://doi.org/10.1159/000118661>
- Alp, E., Perçin, D., Colakoğlu, S., Durmaz, S., Kürkcü, C. A., Ekincioglu, P., & Güneş, T. (2013). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *The Journal of hospital infection*, 84(2), 178–180. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.03.002>
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*- the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 71(0), 78–91. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3792>
- Al-Zahrani IA. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenge. *Saudi Med J*. 2018 Sep;39(9):861-872. doi: 10.15537/smj.2018.9.22840.
- Ambler R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Arman, D. (2006). Yoğun bakım ünitesi enfeksiyonları: Etiyoloji, epidemiyoloji ve risk faktörleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2(46), 1-5.
- Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G. M., & Cornaglia, G. (2004). Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(1), 282–283. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh321>

- Behzadi, P., Baráth, Z., & Gajdác, M. (2021). It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(1), 42. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042>
- Bialvaei, A. Z., Kafil, H. S., Asgharzadeh, M., Yousef Memar, M., & Yousefi, M. (2016). Current methods for the identification of carbapenemases. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, *28*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000063>
- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F. (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *66*(8), 1290–1297. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>
- Bouslah Z. (2020). Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Medecine et maladies infectieuses*, *50*(6), 466–479. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.12.002>
- Braz, V. S., Furlan, J. P., Fernandes, A. F., & Stehling, E. G. (2016). Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, *363*(16), fnw166. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw166>
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, B., Morse, S. A., & Mietzner, T. (2013). Medical Microbiology. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th Ed, McGraw-Hill Companies, New York, 149-405.
- Budak, S., Aktaş, Z., & Erdem, H. (2012). Enterik Gram-negatif bakterilerde laboratuvaran kliniğe karbapenemazlar. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, *1*, 1.
- Buehrle, D. J., Shields, R. K., Clarke, L. G., Potoski, B. A., Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2016). Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Microbiologic Treatment Failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(1), e01243-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01243-16>
- Bulut, Y., & Çağlar, H. (2013). Gram negatif non-fermantatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz enziminin farklı yöntemlerle gösterilmesi. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg*, *27*(3), 135-40.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, *33*(2), e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Carvalho, R. M., Marques, S. G., Gonçalves, L. H., Abreu, A. G., Monteiro, S. G., & Gonçalves, A. G. (2013). Phenotypic detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *46*(4), 506–509. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1451-2013>

- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Costello, A., Davies, T. A., & Jones, R. N. (2014). Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *69*(7), 1804-1814.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2009). *Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, Klebsiella spp. and E. coli from rectal swabs*. United States Department of Health and Human Services. Atlanta, GA.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: U.S.
- Cesur, S., Yıldız, E., Irmak, H., Gülay, Z., Arslan, U., Özen, S., ... & Demiröz, A. P. (2012). Metallobeta-Lactamase Enzymes and Antibiotic Susceptibilities in Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Intensive Care Units in Turkey.
- Chong, P. M., McCorrister, S. J., Unger, M. S., Boyd, D. A., Mulvey, M. R., & Westmacott, G. R. (2015). MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *Journal of microbiological methods*, *111*, 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.024>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth informational supplement M100-S25. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, *6*(1), 1.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?. *The Lancet. Infectious diseases*, *11*(5), 381–393. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1)
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?. *The Lancet. Infectious diseases*, *11*(5), 381–393. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1)
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology : IJMM*, *303*(6-7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Çelik, N. (2007). Çoğul dirençli nozokomiyal pseudomonas aeruginosa suşlarında beta laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi.
- Çopur Çiçek, A., Ertürk, A., Ejder, N., Rakici, E., Kostakoğlu, U., Esen Yıldız, İ., Özyurt, S., & Sönmez, E. (2021). Screening of Antimicrobial Resistance Genes and Epidemiological Features in Hospital and Community-Associated Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Infection and drug resistance*, *14*, 1517–1526. <https://doi.org/10.2147/IDR.S299742>

- Daury, L., Orange, F., Taveau, J. C., Verchère, A., Monlezun, L., Gounou, C., Marreddy, R. K., Picard, M., Broutin, I., Pos, K. M., & Lambert, O. (2016). Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nature communications*, 7, 10731. <https://doi.org/10.1038/ncomms10731>
- De Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050 *PLoS medicine*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(9), 831–838. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading, England)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
- Dortet, L., Bréchar, L., Cuzon, G., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2441–2445. <https://doi.org/10.1128/AAC.01239-13>
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3773–3776. <https://doi.org/10.1128/JCM.01597-12>
- Dortet, L., Poirel, L., Errera, C., & Nordmann, P. (2014). CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2359–2364. <https://doi.org/10.1128/JCM.00594-14>
- Duman, Y., Kuzucu, Ç., Kaysadu, H., & Tekerekoğlu, M. S. (2012). Bir yıllık sürede izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılığının araştırılması: Kesitsel bir çalışma. *Annals of Health Sciences Research*, 1(1), 41-45.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2022) (ECDC) Surveillance Report Antimicrobial Resistance In The Eu/Eea (Ears-Net)
- European Centre for Disease Prevention and Control (2023). (ECDC) Surveillance Report Antimicrobial Resistance In The Eu/Eea (Ears-Net)
- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E., & Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future microbiology*, 10(10), 1683–1706. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48>

- Erdem, B. (1999). Pseudomonaslar, Ustaçelebi Ş. (ed):Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabı içinde, Gündeş Kitapevi, Ankara, 551-7
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Temmuz 2017). EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve direnç özelliklerini saptama kılavuzu Versiyon 2.01
- European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization. Regional Office for Europe. (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/351141>. Accessed 24 Nov 2022
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 13.1, valid from 2023.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2023). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *EUCAST Clinical Breakpoint Tables*, 12. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2015). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *EUCAST Clinical Breakpoint Tables*, 12. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Diagnostic microbiology* (pp. 288-302). St Louis: Mosby.
- Fredens, J., Wang, K., de la Torre, D., Funke, L. F. H., Robertson, W. E., Christova, Y., Chia, T., Schmied, W. H., Dunkelmann, D. L., Beránek, V., Uttamapinant, C., Llamazares, A. G., Elliott, T. S., & Chin, J. W. (2019). Total synthesis of Escherichia coli with a recoded genome. *Nature*, 569(7757), 514–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5>
- Giske, C. G., Martinez-Martinez, L., Canton, R., Stefani, S., Skov, R., Glupczynski, Y., ... & Gniadkowski, M. (2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Glen, K. A., & Lamont, I. L. (2021). β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1638. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>
- Grosso-Becerra, M. V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J. L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L. D., & Soberón-Chávez, G. (2014). Pseudomonas aeruginosa clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC genomics*, 15, 318. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>
- Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2022). The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *The Yale journal of biology and medicine*, 95(4), 507–515.

- Hammoudi, D., Moubareck, C. A., & Sarkis, D. K. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of microbiological methods*, *107*, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>
- Heinrichs, A., Huang, T. D., Berhin, C., Bogaerts, P., & Glupczynski, Y. (2015). Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *34*(7), 1467–1474. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2376-z>
- Henry DA, Speert DP. (2011) *Pseudomonas*. İçinde: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. Vol.1. (10th ed) Washington DC, s: 677-691.
- Hernández-García, M., Cabello, M., Ponce-Alonso, M., Herrador-Gómez, P. M., Gioia, F., Cobo, J., Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2024). First detection in Spain of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two patients transferred from Ukraine to a university hospital. *Journal of global antimicrobial resistance*, *36*, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.12.022>
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, *10*(4), 441–451. <https://doi.org/10.1586/erp.10.49>
- Høiby, N., Ciofu, O., & Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology*, *5*(11), 1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, *47*(2), 81–97. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical microbiology reviews*, *32*(4), e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- Hsueh P. R. (2010). New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, *109*(10), 685–687. [https://doi.org/10.1016/s0929-6646\(10\)60111-8](https://doi.org/10.1016/s0929-6646(10)60111-8)
- Jean, S. S., Harnod, D., & Hsueh, P. R. (2022). Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*, 823684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
- Jorgensen JH, Pfaller MA. *Pseudomonas*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 11th Edition. 2015:773-784 ISBN: 978-1-55581-737-4.
- Karaaslan, A., & Soysal, A. (2017). Carbapenemases. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, *11*(1), I23-I28. <https://doi.org/10.5578/ced.58665>

- Kılıç, Ü., Demiray, T., & Altındış, M. (2016). Karbapenemaz Üreten Enterobacteriaceae İzolatlarının Saptanmasında Fenotipik ve Genotipik Metotlar. *Ankem Derg*, 30(2), 62–75. <https://doi.org/10.5222/ankem.2016.062>
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A., & Cheang, M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine*, 34(6), 1589–1596. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B., Kim, Y. A., Yong, D., & Yum, J. H. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(2), 88–91. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x>
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 302(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
- Liao, Y. C., Cheng, H. W., Wu, H. C., Kuo, S. C., Lauderdale, T. Y., & Chen, F. J. (2019). Completing Circular Bacterial Genomes With Assembly Complexity by Using a Sampling Strategy From a Single MinION Run With Barcoding. *Frontiers in microbiology*, 10, 2068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02068>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J. D., Riccio, M. L., Perilli, M., Coli, A., Amicosante, G., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. (2002). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4051–4055. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4051-4055.2002>
- Losito, A. R., Raffaelli, F., Del Giacomo, P., & Tumbarello, M. (2022). New Drugs for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with Limited Treatment Options: A Narrative Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(5), 579. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050579>
- Malkoçoğlu, G., Aktaş, E., Bayraktar, B., Otlu, B., & Bulut, M. E. (2017). VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(3), 328–334. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0012>

- Maltezou H. C. (2009). Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 405.e1–405.e4057. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.003>
- Mangayarkarasi, V., Moses, S. P., Swarna, S. R., Kalaiselvi, K., & Fathima, S. S. (2018). In-house standardization of Carba NP test for carbapenemase detection in gram negative bacteria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 7(01), 2876-2881.
- May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., & Rothmel, R. K. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical microbiology reviews*, 4(2), 191–206. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.2.191>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover BC (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. 9 th ed. Washington: ASM press; 2007.p.734-48. 9. Erdem B. Pseudomonaslar. Ustaçelebi ğ (editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji’de. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. s.551-8. 51 10.
- Nordmann P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Medecine et maladies infectieuses*, 44(2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(3), 487–489. <https://doi.org/10.1093/jac/dks426>
- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet. Infectious diseases*, 9(4), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
- Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria?. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(4), 689–692. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq520>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 21-22, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Osei Sekyere, J., Govinden, U., & Essack, S. Y. (2015). Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of applied microbiology*, 119(5), 1219–1233. <https://doi.org/10.1111/jam.12918>

- Perry, J. D., Naqvi, S. H., Mirza, I. A., Alizai, S. A., Hussain, A., Ghirardi, S., Orega, S., Wilkinson, K., Woodford, N., Zhang, J., Livermore, D. M., Abbasi, S. A., & Raza, M. W. (2011). Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(10), 2288–2294. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr299>
- Pitout, J. D., Gregson, D. B., Poirel, L., McClure, J. A., Le, P., & Church, D. L. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3129–3135. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *Journal of clinical microbiology*, 53(9), 3003–3008. <https://doi.org/10.1128/JCM.00977-15>
- Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., & Nordmann, P. (2004). Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1406–1409. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1406-1409.2004>
- Poirel, L., Ozdamar, M., Ocampo-Sosa, A. A., Türkoglu, S., Ozer, U. G., & Nordmann, P. (2012). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2784–2785. <https://doi.org/10.1128/AAC.00150-12>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Poole K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*, 2, 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, 45(6), 568–585. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Pottinger P., Reller LB. ve Ryan KJ. (2014). *Pseudomonas* and other opportunistic Gram-negative bacilli. In: Sherris Medical Microbiology. New York, 7th Ed., 617-626.
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning.
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Cantón, R., & Oliver, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 2022–2027. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>

- Rizek, C., Fu, L., Dos Santos, L. C., Leite, G., Ramos, J., Rossi, F., Guimaraes, T., Levin, A. S., & Costa, S. F. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *13*, 43. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0043-3>
- Rudresh, S. M., Ravi, G. S., Sunitha, L., Hajira, S. N., Kalaiarasan, E., & Harish, B. N. (2017). Simple, rapid, and cost-effective modified Carba NP test for carbapenemase detection among Gram-negative bacteria. *Journal of laboratory physicians*, *9*(4), 303–307. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_138_16
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Pawar, J. S., Akhter, N., & Lucy, I. B. (2023). Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi journal of biological sciences*, *30*(3), 103582. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582>
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care*, *8*, 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
- Shaaban, M., Al-Qahtani, A., Al-Ahdal, M., & Barwa, R. (2018). Molecular characterization of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to carbapenems. *Journal of infection in developing countries*, *11*(12), 935–943. <https://doi.org/10.3855/jidc.9501>
- Shen, M., Zhang, H., Shen, W., Zou, Z., Lu, S., Li, G., He, X., Agnello, M., Shi, W., Hu, F., & Le, S. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation. *Nucleic acids research*, *46*(9), 4505–4514. <https://doi.org/10.1093/nar/gky160>
- Simner, P. J., Johnson, J. K., Brasso, W. B., Anderson, K., Lonsway, D. R., Pierce, V. M., Bobenchik, A. M., Lockett, Z. C., Charnot-Katsikas, A., Westblade, L. F., Yoo, B. B., Jenkins, S. G., Limbago, B. M., Das, S., & Roe-Carpenter, D. E. (2017). Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology*, *56*(1), e01369-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01369-17>
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, *406*(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58 (9):1133-1148. 64. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. İn Ustaçelebi Ş. (ed) .Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitapevi, 1999: 91-101.
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment.

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Talaro KP. ve Chess B. The Gram-negative bacilli of medical importance. In: Foundations in Microbiology. 8th ed. The McGraw-Hill Companies, New York, 2012, s.599-603.
- Tamma, P. D., & Simner, P. J. (2018). Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 56(11), e01140-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>
- Tamma, P. D., Opene, B. N., Gluck, A., Chambers, K. K., Carroll, K. C., & Simner, P. J. (2017). Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 55(4), 1046–1055. <https://doi.org/10.1128/JCM.02338-16>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.0, 2023. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Thomson, G., Turner, D., Brasso, W., Kircher, S., Guillet, T., & Thomson, K. (2017). High-Stringency Evaluation of the Automated BD Phoenix CPO Detect and Rapidec Carba NP Tests for Detection and Classification of Carbapenemases. *Journal of clinical microbiology*, 55(12), 3437–3443. <https://doi.org/10.1128/JCM.01215-17>
- Tian, Z. X., Yi, X. X., Cho, A., O'Gara, F., & Wang, Y. P. (2016). CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical nalB-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 12(10), e1005932. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005932>
- Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2013). Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(9), 4578–4580. <https://doi.org/10.1128/AAC.00878-13>
- Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2014). Reply to "further proofs of concept for the Carba NP test". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(2), 1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.02285-13>
- Vahaboğlu H. ve Akhan S. P. *aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. In: Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008, s. 2175-2186.
- Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). 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*, 10(3), e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
- Van Duin, D., & Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4),460–469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
- Vázquez-Ucha, J. C., Arca-Suárez, J., Bou, G., & Beceiro, A. (2020). New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the Way for the β -Lactams. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9308. <https://doi.org/10.3390/ijms21239308>
- Walsh T. R. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*, 36 Suppl 3, S8–S14. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(3), 373–383. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(3), 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), 147–151. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147>
- Yao JDC. ve Moellering RC. Antibakteriyel ajanlar. İn: Murray PR., Boran EJ., Jorgensen JH., Landry ML., Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Köksal İ. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Atlas kitapçılık, Ankara, 2009, s.1077-1137.
- Yong, D., Lee, K., Yum, J. H., Shin, H. B., Rossolini, G. M., & Chong, Y. (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3798–3801. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3798-3801.2002>
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 12, 614058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>
- Yusuf, E., Van Der Meeren, S., Schallier, A., & Piérard, D. (2014). Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(12), 2237–2240. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2199-3>
- Xia, J., Gao, J., & Tang, W. (2016). Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Bioscience trends*, 10(1), 14–21. <https://doi.org/10.5582/bst.2016.01020>

- Xu, J., Duan, X., Wu, H., & Zhou, Q. (2013). Surveillance and correlation of antimicrobial usage and resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: a hospital population-based study. *PloS one*, 8(11), e78604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078604>
- Zhang, Y., Chen, X. L., Huang, A. W., Liu, S. L., Liu, W. J., Zhang, N., & Lu, X. Z. (2016). Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerging microbes & infections*, 5(3), e27. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.22>
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2010). Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical reviews in microbiology*, 36(3), 245–258. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.481763>

9. BİLİMSEL FAALİYETLER

Karali H., Güncü M. M., Aksu B. (2024). "Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa'nın Karbapenemaz Üretimi ve Tiplendirilmesinde Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Değerlendirilmesi. Journal of Health Sciences and Management, 4(2).

Karali. H. (2024). KLİMUD- Temel Moleküler Mikrobiyolojik Tanı Kursu'nda eğitmen yardımcısı olarak görev almıştır. (16-17 Mayıs 2024/İSTANBUL)

Karali. H. (2024). TMC- 15. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (9-11 Mayıs 2024/İSTANBUL)

Karali. H. (2024). TMC- 9. Anaerop Bakteriyoloji Kursu'nda eğitmen yardımcısı olarak görev almıştır. (16-18 Nisan 2024/İSTANBUL)

Karali H., Aksu B. (2023). Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Carbapenemase Production and Typing in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Various Clinical Samples. BIO Türkiye-Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi, İstanbul, Türkiye. <https://www.bioturkiye.org/congress/>

Karali. H. (2023). TMC- 8. Anaerop Bakteriyoloji Kursu'nda eğitmen yardımcısı olarak görev almıştır. (13-15 Eylül 2023/İSTANBUL)

Karali. H. (2023). TMC- 7. Anaerop Bakteriyoloji Kursu'nda eğitmen yardımcısı olarak görev almıştır. (26-28 Nisan 2023/İSTANBUL)