

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL

**KARBAPENEMLERE DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* KÖKENLERİNDE METALLO BETA
LAKTAMAZ ENZİMLERİNİN FENOTİPİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Mükerrerem Duygu AKSOY

EDİRNE-2013

TEŞEKKÜR

Değerli danışmanım Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL'a ve asistanlık eğitimimizde emeği olan Prof. Dr. Şaban ÇAVUŞLU'ya, Prof. Dr. Şaban GÜRCAN'a, Prof. Dr. Nermin ŞAKRU'ya, Doç. Dr. Neşe AKIŞ'a, tez çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyen ve bazı kontrol kökenlerini temin eden Doç. Dr. Zerrin AKTAŞ'a, Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN'a ve Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye, Araş. Gör. Şebnem BUKAVAZ'a, değerli asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar personeli arkadaşlarıma tümüne en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
METALLO BETA LAKTAMAZLAR VE DÜNYADAKİ DAĞILIMI	11
METALLO BETA LAKTAMAZLARIN TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	19
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
BULGULAR	29
TARTIŞMA.....	37
SONUÇLAR.....	44
ÖZET	46
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
AIM	: Australian İmipenemase
CAZ	: Seftazidim
ÇDST	: Çift Disk Sinerji Testi
DIM	: Dutch İmipenemase
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
FIM	: Floransa İmipenemase
GES	: Guiana Extended Spectrum
GIM	: German İmipenemase
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar
HE	: Hastane Enfeksiyonu
HKP	: Hastane Kökenli Pnömoni
IMP	: İmipenemase
IPM	: İmipenem
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KDDT	: Kombine Disk Difüzyon Testi
KHM	: Kyorin University Hospital Metallo Beta Laktamase
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
MBL	: Metallo Beta Laktamaz

MEM	: Meropenem
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Buyyon
MHT	: Modifiye Hodge Testi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NDM	: New Delhi Metallo Beta Laktamase
OPR	: Outer Membrane Protein
OXA	: Oksasilinaz
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PSE	: <i>Pseudomonas</i> Spesifik Enzim
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SIM	: Seul İmipenemase
SPM	: Sao Paulo Metallo Beta Laktamase
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TMB	: Tripoli Metallo Beta Laktamase
VIM	: Verona İmipenemase
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

GİRİŞ VE AMAÇ

Gram negatif, nonfermentatif bir çomak olan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) çevremizdeki her ortamda bulunabilmektedir. Ne yazık ki, hastane ortamında nemli bölgelerde, yiyeceklerde, çiçeklerde, lavabolarda, tuvaletlerde, yer temizlik bezlerinde, solunum cihazlarında ve diyaliz ekipmanlarında ve hatta dezenfektan solüsyonlarında bile canlılıklarını sürdürebilmektedir. Özellikle hastanede yatan veya ayaktan tedavi gören bağışık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (1).

Basit ortamlarda üreyebilen *P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençlidir. Ayrıca yüksek oranda kazanılmış direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle tedavisi güç olan ve hayatı tehdit eden hastane enfeksiyonu (HE) etkenleri arasında sıklıkla yer almaktadır. *Pseudomonas*'lar yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ), yanık ünitelerinde, mekanik ventilatörlerde, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invaziv enfeksiyonlara da yatkınlık oluşturmaktadır (1).

Son yıllarda, *P. aeruginosa* kökenlerinde gelişen çoklu antibiyotik direnci dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmektedir. Başta sefalosporinler olmak üzere pek çok antibiyotiğe direnç nedeniyle karbapenemler tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak son yıllarda karbapenemlere dirençli kökenler özellikle HE etkeni olarak izole edilmektedirler. *P. aeruginosa* ve diğer gram negatif bakterilerin karbapenemlere direnç geliştirmesinde en önemli mekanizmalardan biri karbapenemazların üretimidir. Karbapenemaz enzimleri arasından aktif bölgelerinde metal iyonları taşıyanlar metallo beta laktamaz (MBL) olarak adlandırılır. Bu enzimler monobaktamlar hariç, karbapenemleri de kapsayan beta laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumludurlar. Direnç genleri plazmid ve transpozonlarla taşındığı için diğer bakterilere de aktarabilmektedir (2).

Bu nedenle MBL enzimlerinin gram negatif bakteriler arasında yayılması ülkemiz ve bütün dünya ülkeleri açısından büyük bir sorun oluşturmaktadır.

Ülkemizde de MBL enzimlerine sahip izolatlar pek çok ilden bildirilmektedir. İlk kez 2004 yılında Ankara'dan Verona İmipenemase (VIM) tipi MBL bir *P. aeruginosa* kökeninde bildirilmiştir (3). Daha sonra günümüze kadar birçok vaka bildirimi yapılmıştır ve bunlardan çoğunda VIM tipi MBL tespit edilmiştir (4-7).

Bu çalışmada Edirne ve çevresinde izole edilen karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde fenotipik ve genotipik yöntemlerle MBL varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Nonfermentatif bakteriler son yıllarda artan HE'lere neden olmaları sebebiyle daha da önem kazanmaktadır. Özellikle dış ortamda canlılığını uzun süre sürdürebilmesi ve tedavide kullanılan ilaçlara direnç geliştirmesi başta immün sistemi baskılanmış olgular olmak üzere, mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son yıllarda ortaya çıkan ve tüm dünyada yayılan MBL direnci nedeni ile tedavide ciddi sıkıntılarla karşılaşmaktadır.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Fırsatçı bir patojen olarak kabul edilen *Pseudomonas*'lar insanlarda birçok enfeksiyona neden olmaktadır. Toprakta ve suda sıklıkla bulunan, zor koşullar altında canlı kalabilen *P. aeruginosa*; kistik fibrosis, yanık enfeksiyonu ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ile enfekte hastalar gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olabilir (1).

Morfoloji, Biyokimyasal ve Kültür Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa aerop, sporsuz, düz veya hafif kıvrımlı, 0.5-1 µm genişliğinde, 1.5-5 µm uzunluğunda gram negatif bir basildir. Bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiği vardır ve bu nedenle çok hareketlidir. Piyosiyanin adı verilen çözünür fenazin pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Piyosiyanin dışında bakteri kırmızı pigmentten sorumlu piyorubin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti içerebilir. Laboratuvarlarda, Triptik Soy Agar, Koyun Kanlı Agar, Çukolata Agar, Mueller Hinton Agar (MHA), Eozin Metilen Blue Agar ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde 30-37°C'de kolaylıkla üreyebilir; 42°C'de üreyebilme özelliği tür ayrımında önemlidir.

P. aeruginosa oksidaz pozitif olması ve glikozu fermente etmemesi ile *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerinden ayrılır. Laktoz ve sakkaroz etkisizdir. Katalaz ve L-arginin dihidrolaz oluşturur; indol ve H₂S oluşturmaz. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatiftir; potasyum siyanüre dirençlidir (8,9).

Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi

Hastane enfeksiyonlarında 1940'lara kadar Streptokoklar başta gelirken, antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle Stafilokoklar baskın hale gelmiştir. 1960-1970'li yıllarda penisilinlere dirençli Stafilokoklara etkili antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler ve *P. aeruginosa* gibi gram negatif basiller ön plana çıkmıştır; ve bu bakteri 1990'lı yıllarda bazı antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeye başlamış ve günümüze kadar farklı direnç mekanizmaları geliştirerek HE etkenleri arasında önemli bir yere sahip olmuştur (10).

Farklı çevresel yerleşim gösteren *P. aeruginosa*, kolay üreyebilen, pek çok antibiyotiğe ve dezenfektana direnç gösterebilen fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa* hidrofilik olup lavabolar, sebzeler, nehir suları gibi nemli ortamlarda, hastanelerde, tuvaletlerde, temizlik malzemelerinde, yiyeceklerde, çiçeklerde bulunabilirken, normal ev ortamını nadiren kontamine eder (1). İnsan patojeni olan *P. aeruginosa* sağlıklı kişilerde kolonize olabilir ancak bunlarda saprofitir. Kolonizasyon sıklığı deride %0-2, burun mukozasında %0-3.3, boğazda %0-6.6, dışkıda %2.6-24 arasındadır. Özellikle yüksek risk grubundaki hastalarda (immün yetmezlik, yanık, lösemi, kistik fibrozis) enfeksiyonlara neden olabilmektedir ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardaki *P. aeruginosa* oranı çeşitli vücut bölgelerine, hastanın yattığı bölüme ve farklı hastanelere göre değişmektedir. *P. aeruginosa*'ya bağlı HE'ler genellikle mekanik ventilasyon cihazına bağlanan olgularda, yanık olgularında, kemoterapi veya cerrahi girişimde bulunan hastalarda gelişmektedir (8,9,11). Damar içi ilaç kullanıcılarında endokardit ve osteomyelite, bronşektazi gibi altta yatan akciğer hastalığı olanlarda toplum kaynaklı pnömoniye, genellikle travma ve cerrahi uygulamayı takiben menenjitte, diyabetik hastalarda malign eksternal otite, yenidoğanda sepsis ve menenjitte, üriner sistemde kompleks anomalisi olan hastalarda idrar yolu enfeksiyonlarına ve peritonite yol açabilir. *P. aeruginosa* ayak tabanının delici yaralanmalarını takiben gelişen osteokondritlerin en sık etkenidir. Uzun sürelerle yüzen kişilerde sağlıklı konak için kendi kendini sınırlayan, yüzeysel antimikrobiyal ajanlara yanıt veren bir hastalık olan dış kulak enfeksiyonlarına ve kontakt lens kullanıcılarında hijyenin zayıf olduğu, lenslerin uzun süreli kullanıldığı durumlarda ise konjonktivite neden olmaktadır (1,8).

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Hastane Enfeksiyonu Etkenleri Arasındaki Yeri**

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre HE sıklığı %3-14 arasında değişmekte olup bu oran YBÜ ve yanık üniteleri gibi birimlerde %20-40'lara çıkmaktadır (12). Tüm HE'lerin yaklaşık %40'ından fazlasını üriner sistem enfeksiyonları oluşturmaktadır (13). Üroloji kliniklerinde yapılan, ülkemizin de dahil olduğu çok merkezli çalışmada *Pseudomonas spp.* üriner sistem enfeksiyonlarında (%13) etken olarak ikinci sıklıkta gözlenmiştir (14). Hastane kaynaklı pnömoniler, YBÜ'de en sık görülen HE iken, diğer servislerde ikinci veya üçüncü sıklıkta görülen enfeksiyonlardır (12). Ak ve ark. (15) YBÜ'nde yapmış olduğu bir çalışmada nozokomiyal pnömoni oranı %40.5 olarak saptanmıştır, en sık izole edilen etkenler ise *Acinetobacter spp.* (%23.8), *P. aeruginosa* (%21.4) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) (%19.1)' dir. Ülkemizde YBÜ'de yapılan bir diğer çalışmada en sık görülen enfeksiyon ventilatör ilişkili pnömoni (%41.2) ve hastalardan en sık izole edilen patojen *Pseudomonas spp.* (%31.3) olarak saptanmıştır (16). Yine benzer bir çalışmada, Rocha ve ark. (17) ventilatör ilişkili pnömonilerde *P. aeruginosa* izolasyon oranını %29 olarak saptamışlardır. Cerrahi alan enfeksiyonunun ise, her yıl cerrahi müdahale uygulanan 16 milyon hastanın %2-5'inde geliştiği düşünülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her 24 cerrahi hastadan birinde enfeksiyon gelişimi söz konusudur (12). Ülkemizde yapılan bir çalışmada Yurtsever ve ark. (18) tarafından 2007 yılında yara yeri örneğinden izole edilen 1126 etkenin 881'ini (%78.2) gram negatif bakteri olarak saptamışlardır. En sık izole edilen bakteriler sırasıyla *E. coli* (%26.8) olup, *P. aeruginosa* (%18.3) ikinci sırada yer almaktadır. Sümer ve ark.'nın (19) yapmış olduğu cerrahi alan enfeksiyonları çalışmasında ise, *Pseudomonas spp.* izolasyon sıklığı %13.6'dır. HE'ler arasında mortalitesi en yüksek olan enfeksiyon türleri bakteriyemilerdir. Kang ve ark. (20) *P. aeruginosa* bakteriyemisi saptanan 136 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada mortalite oranını %39 olarak bildirmişlerdir. Kan dolaşımı enfeksiyonları arasında %3.8'inde etken olarak *P. aeruginosa* saptamışlardır. Yapılan bir diğer çalışmada *P. aeruginosa*'nın neden olduğu bakteriyeminin 30 günde mortalite oranı %20.9 olarak bulunmuştur (21).

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Virulans Faktörleri**

P. aeruginosa'ya özgü çeşitli yapılar, proteazlar ve toksinler hastalık oluşumuna yardımcı virulans faktörlerindendir (Tablo 1).

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulans faktörleri (9)

Ürün	Rolü
Piluslar ve pilus olmayan adezinler	Akciğerlere ve yara bölgesine yerleşimi sağlar.
Aljinat (slime tabakası)	Tutunma ve fagositozun engellenmesi, bazı antibiyotiklere direnci sağlar.
Lipopolisakkarit	Septik şok, bazı antibiyotiklere direnci sağlar.
Nöraminidaz	Piluslarla yapışmayı kolaylaştırır.
Ekzotoksin A	Difteri toksini gibi EF-2'yi etkileyerek doku hasarı yapar, fagositozu engeller.
Ekzoenzim S	Konak hücre G proteinlerini etkiler ve fagositozu engeller.
Elastaz	Damarlar ve akciğerleri hasarlandırır, immün kompleks depolanmasından da sorumludur.
Diğer proteazlar	Akciğer ve diğer dokularda hasara neden olur.

EF-2: Elongasyon Faktör-2.

Piyosinin pigmenti yeşil renkli floresin ve turkuaz mavisi renklidir. Piyoverdin, bir siderofordur, çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlamaktadır (22).

Antimikrobiyal Direnç ve Mekanizmaları

Pseudomonas'lar antistafilokokkal penisilinler, sulbaktam-ampisilin, ampisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asit, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, trimetoprim sulfametaksazol, nalidiksik asit, vankomisine dirençlidir. Antipseudomonal penisilinlere (tikarsilin ve piperasilin), siprofloksasine, sefoperazona, seftazidime (CAZ), aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), meropenem (MEM) ve imipenem (IPM) toplumdan kazanılmış *P. aeruginosa* izolatları duyarlıdır. Tikarsilin, piperasilin, CAZ, sefepim, sefpirom, sefoperazon, karbapenemler ve aztreonam antipseudomonal beta laktamlı antibiyotiklerdir.

Antibiyotiklerin yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir. *Pseudomonas*'larda kromozomal ve plazmid kaynaklı beta laktamazların üretimi, antibiyotik hedeflerinde değişiklik yapan penisilin bağlayan proteinlerdeki değişim, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, aktif dışa pompalama sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasına bağlı direnç mekanizmaları mevcuttur. *P. aeruginosa*'nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirme mekanizmaları Tablo 2'de özetlenmiştir (23).

P. aeruginosa kökenlerinde direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası mekanizmalar her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermektedir. *P. aeruginosa* kökenlerinin aminoglikozidlere, karbapenemlere, sefalosporinlere ve florokinolonlara direnç oranları Avrupa'nın kuzeybatısında özellikle İskandinavya'da düşük iken (<%10), güneydoğusunda özellikle Yunanistan'da yüksektir (%25-54). Latin Amerika ve Güneydoğu Asya'da yüksek iken, Amerika Birleşik Devletleri'nde orta seviyededir (24,25). 2011 yılında karbapenem direnci 29 Avrupa ülkesinden ortalama %18.6 oranında bildirilmiştir. Ülkeler tarafından bildirilen dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinin yüzdeleri %3.5 (Hollanda) - %66.7 (Romanya) arasında değişmektedir. Romanya'dan 10'dan az kökende bildirim yapılmıştır. 2008-2011 yılları arasında karbapenem direncinde anlamlı artış Avusturya, Kıbrıs Rum kesimi, Danimarka, Yunanistan ve Fransa gibi ülkelerde gözlenmiştir. *P. aeruginosa* kökenlerinde karbapenem direnci komşu ülkelerden Bulgaristan'da %29.2 iken, Yunanistan'da %54 oranındadır (26). Türkiye'den 10 merkezin katıldığı 16 ülkede yürütülen 'Comparative Activity of Carbapenem Testing Study' başlıklı karbapenem aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada klinik kökenlerin %49.8'ini *Pseudomonas* spp. oluşturmaktadır, tüm kökenlerin %31.5'ini en az bir karbapeneme dirençli olarak saptamışlardır (27). Benzer şekilde 2010 yılı ulusal hastane enfeksiyonları surveyansı verilerine göre karbapenem dirençli *P. aeruginosa* oranı %31 olarak saptanmıştır (28).

Tablo 2. *Pseudomonas aeruginosa*'da çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları (23)

Etkilenen Antibiyotik	Mekanizma
Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	İndüklenebilir Amp C tipi kromozomal beta-laktamazların, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların varlığı
Karbapenemler	OprD kaybı ve aktif pompa sistemlerinin, karbapenemazların, plazmid kökenli metalloenzimlerin varlığı
Aminoglikozidler	Aminoglikozid yapısını değiştiren enzimlerin varlığı ve aktif pompa sistemlerinin işleme
Kinolonlar	DNA giraz A mutasyonlarının oluşumu ve aktif pompa sistemlerinin işleme
Çoğul direnç	Aktif pompa sistemlerinin işleme ve hücre duvar geçirgenliğinin düşük olması

OprD: Outer membrane protein D.

1. Aktif dışa pompalama sistemleri: İlaç direncine neden olan mekanizmalardan biri ilaç atım pompalarıdır. Aktif dışa pompalama sistemleri, düzenleyici genler ile kontrol

altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasına ve antimikrobiyallerin de dışarı atılmasına neden olur. Bu sistem iki bileşen ve bir proteinden oluşur. MexB, MexD, MexF ve MexY sitoplazmik zar da bulunan birinci bileşeni oluşturan proteindir, enerji bağımlı pompa gibi çalışır. İkinci bileşen Outer membrane protein (Opr) J, OprN ve OprM ise dış membran proteininde kapı konumundadır. Üçüncü protein MexA, MexC, MexE ve MexX periplazmik boşluk içinde yer almaktadır ve diğer iki bileşeni bağlamaktadır (Tablo 3) (29). En iyi tanımlanmış olanı MexAB-OprM'dir. MexAB-OprM, *P. aeruginosa*' da MEM'nin de içinde bulunduğu çoğul antibiyotik direncine ve aktif dışa pompalama sistemlerinde aşırı salınmaya neden olurlar (30,31). MexCD-OprJ aktif pompalama sistemi genellikle 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN sisteminin de aktif hale gelmesi ile oluşan *nfxC* mutantları özellikle IPM ağırlıklı olarak karbapenem direncine neden olmaktadır (32). Ayrıca, OprD kaybı ile birlikte MexXY-OprM sistemlerinin de karbapenem direncine neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (33,34).

Tablo 3. *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan aktif dışa pompalama sistemlerinin yapısı ve substratları (29)

Sitoplazmik membrane pompası	Periplazmik bağlayıcı	Dış membran kanalı	Substratlar
MexB	MexA	OprM	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, novobiosine, imipenem hariç beta laktamlar
MexD	MexC	OprJ	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, novobiosine, karbenisilin hariç penisilinler, sefepim, sefpirom
MexF	MexE	OprN	Fluorokinolonlar, karbapenemler
MexY	MexX	OprM	Kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler, linkomisin, kloramfenikol, aminoglikozidler, karbenisilin hariç penisilinler ve sefepim, sefpirom, meropenem

Opr: Outer membrane protein.

2. Dış membran porin defektleri: *P. aeruginosa*' da görülen ilaç direncinin diğer bir nedeni dış membran geçirgenliğinin azalmasıdır. Antibiyotikler dış membrandan OprF, OprC, OprD gibi kanallardan hücre içerisine girmektedir. Özellikle beta-laktam antibiyotikler dış membrandan OprF, OprC kanalları aracılığı ile geçmektedir. İmipenem ayrıca D2 proteini adı

verilen özel bir porini kullanarak geçmektedir. Bu yüzden, IPM dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarının çoğunda OprD porin kaybı vardır (35). *P. aeruginosa* tedavisinde ilk haftanın sonunda OprD kaybı ile yaklaşık olarak %50 oranında karbapenem direnci saptandığı gösterilmiştir. OprD mutantların IPM minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) aralığı 8-32 µg/ml, MEM için 2-4 µg/ml olduğu saptanmıştır (32,36).

3. Beta laktamaz enzimleri: Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağını parçalama özellikleriyle beta laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Kromozomal ya da plazmid kaynaklıdır (37). Beta laktamazlar moleküler yapılarında aminoasit dizilerinin benzerliğine bakılarak yapılan Ambler sınıflaması veya 1995 yılında önerilen, günümüzde yaygın olarak kullanılan, özellikle substrat profilleri ve inhibitörlere duyarlılık gibi işlevsel özelliklerinin değerlendirilmesine dayanan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasına göre sınıflandırılabilirler (Tablo 4). Moleküler sınıf A, C ve D’ deki enzimlerin aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulunmaktadır. Moleküler sınıf B’de yer alan enzimler ise aktif bölgelerinde en az bir çinko iyonu bulunan metalloenzimlerdir (38). Karbapenemaz aktivitesi bulunan enzimler B, C, D moleküler sınıflarındadır.

Tablo 4. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri (39)

Beta laktamaz grubu	Alt grup	Molekül sınıfı	EDTA ile İnhibisyon	Özellik
1		C	-	Kromozomal ve plazmid kökenli AmpC tipi enzimler
2	2a	A	-	Penisilinazlar
	2b	A	-	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar
	2be	A	-	Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar
	2br	A	-	İnhibitörlere dirençli beta laktamazlar
	2c	A	-	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	-	Oksasilini hidroliz eden enzimler
	2e	A	-	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar.
	2f	A	-	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3		B	+	Metallo beta laktamazlar. Klavulanik asit ile inhibe olmazlar.
4		?		Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş.

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit.

a. Bush grup 1 veya moleküler sınıf C enzimler (Amp C beta laktamazlar): Kromozomal beta laktamazlar gram negatif basillerin birçoğunda yaygın olarak bulunduğu gibi *P. aeruginosa*'da bu enzimi taşımaktadır. Bu enzimler aktif bölgelerinin özellikleri nedeniyle sefalosporinaz niteliğindedirler bu yüzden enzimi taşıyan *P. aeruginosa* üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç kazanabilir, karbapenem karşı genelde duyarlıdır. Amp C beta-laktamazların karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına rağmen, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (32).

b. Bush grup 2 veya moleküler sınıf A, D beta laktamazlar: Bu beta laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, oksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamı hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar. *P. aeruginosa*'da bu gruplar içinde önemli olarak Temoniera extended beta laktamaz, *Pseudomonas* extended resistant (PER), Vietnam extended beta laktamaz, Guiana extended spectrum (GES), Oksasilinaz (OXA) enzimleri bulunmaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) moleküler sınıf A, fonksiyonel grup 2b'de bulunmaktadır. Bu enzimler dar spektrumlu penisilinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz etmektedirler, karbapenemlere afiniteleri düşüktür. Bunların in vitro aktiviteleri klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe edilebilmektedir. *P. aeruginosa*'larda A sınıfı GSBL'ler 1990 yılının sonrasında tespit edilmiştir. *P. aeruginosa*'da çok iyi bilinen ve plazmidlerce taşınan Temoniera extended beta laktamaz enzimleri dışında, çoğunlukla ülkemiz klinik kökenlerinde bulunan PER enzimi, Güney-Doğu Asya, Fransa ve Bulgaristan'da tespit edilen Vietnam extended beta laktamaz enzimi, Fransa, Yunanistan ve Güney Afrika'da tespit edilen GES enzimleri de mevcuttur (40-42).

Fransa'da 1991 yılında PER-1 enzimi ilk kez bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* kökeninde tanımlanmıştır (43). PER-1, özellikle HE etkeni olarak karşılaşılan gram negatif nonfermentatif bakterilerde bulunmaktadır ve penisilin, tikarsilin, seftazidim gibi anti-psödomonal antibiyotiklere dirençten sorumludur. Grup 2c'de, *P. aeruginosa*'da bulunan, karbenisilini hidroliz eden ve klavulanik asit ile inhibe olan *Pseudomonas* spesifik enzim (PSE) olarak adlandırılan dört adet beta laktamaz bulunmaktadır. Bunlar PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 ve CARB-4 enzimleridir (44). Grup 2f'de bulunan en önemli karbapenemazlar GES-2, *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazı (KPC)-1, KPC-2, KPC-3 gibi enzimlerdir. GES-2 enzimi *P. aeruginosa*'da bulunur ve plazmidde taşınır. GSBL özelliği olan GES-1'in mutantıdır ve bu mutasyonun imipenemaz aktivitesi kazandırması ilginçtir (45). Moleküler sınıf D,

fonksiyonel Grup 2d'de oksasilini hızla hidrolize edebilen OXA grubu enzimler yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'da OXA-2, OXA-10, OXA-18, OXA-50, OXA-198 enzimleri saptanmıştır (46-48). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da *P. aeruginosa* kökenlerinde OXA-10 ve varyantları OXA -11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17 saptanmıştır ve OXA-17'nin sefotaksim, diğerlerinin de seftazidim direncine yol açtıkları gösterilmiştir (49-53). Sevellano ve ark. (54) IPM dirençli iki *P. aeruginosa* kökeninde ilk OXA-40 enzimini göstermişlerdir ve gen dizisi daha önce *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)'de tanımlanan gen ile %100 homoloji göstermiştir. 2003 yılında Texas'da, sınıf D GSBL olan OXA-45 enzimi çoklu ilaç direncine sahip *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir. Substrat profili ve amino asit yapısı en yakın olan OXA -18 ile benzerlik göstermektedir (%65.9), aktivitesi klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (55). MBL ile birlikte sınıf 1 integronlar içinde bulunan OXA enzimleri direncin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. *P. aeruginosa*'da OXA-2 ve MBL olan GIM-1 aynı integronlar içinde bulunmaktadır (56). El Garch ve ark. (48) yaptığı bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere duyarlılığını düşüren, yeni bir karbapenemi hidrolize eden, sınıf D laktamaz OXA-198'i bulmuşlardır.

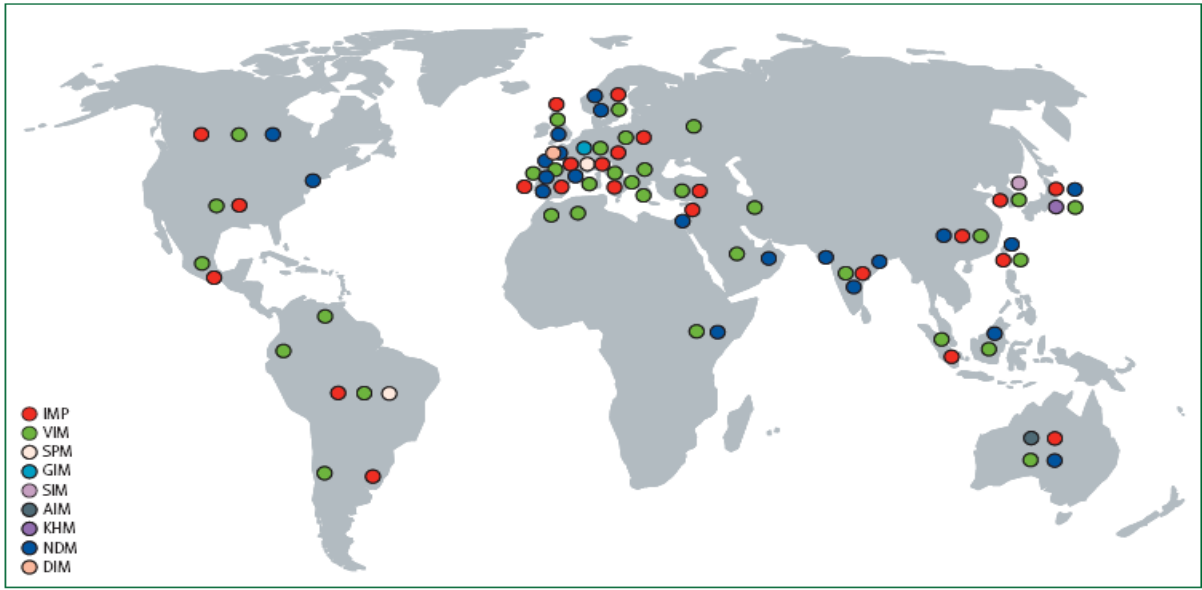
c. Bush grup 3 veya moleküler sınıf B beta laktamazlar: Diğer enzimlerden farklı olarak aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu bulunan MBL olarak isimlendirilen enzimlerdir. Bu gruptaki enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. MBL üreten bakteriler genellikle penisilinlere, sefalosporinlere, karbapenemlere ve beta laktamaz inhibitörlerine dirençli olarak saptanırlar. Bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedir. İlk MBL, Japonya'da geniş çaplı çalışmalar sonucunda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökeninde tespit edilmiştir (57).

d. Bush grup 4 beta laktamazlar: Klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazları içermektedir. Henüz dizi analizi yapılmamış, yapıları tam olarak saptanamamıştır. *Alcaligenes faecalis*, *B. fragilis* kromozomal enzimleri bu gruptadır.

METALLO BETA LAKTAMAZLAR VE DÜNYADAKİ DAĞILIMI

Metallo beta laktamazların aktivitesi çinkoya bağımlıdır. Etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) veya merkaptopropionik asit ile inhibe olabilmektedir. MBL'ler IPM ve MEM'yi iyi hidrolize ederler ancak aztreonama etkisizdirler. Bu enzimler aktif bölgelerindeki çinko iyonu aracılığıyla karbapenemleri hidrolize ettikleri için karbapenemazlar olarak adlandırılırlar (39). Günümüze kadar MBL enzimlerinin çeşitleri ve sayıları hızlı bir artış göstermiştir (Şekil 1). *P. aeruginosa*'da tespit edilen MBL'ler İmipenemaz (IMP), VIM, Sao Paulo İmipenemaz (SPM), Seul İmipenemaz (SIM), German İmipenemaz (GIM), New Delhi Metallo beta

laktamaz (NDM), Australian İmipenemaz (AIM), Floransa İmipenemaz (FIM-1) türleridir. Ayrıca *Pseudomonas*'lar dışında farklı bakterilerde de MBL bulunmuştur. Bunlar, Dutch İmipenemaz (DIM-1), Kyorin University Hospital İmipenemaz (KHM-1), Tripoli Metallo beta laktamaz (TMB-1) enzimleridir (58). MBL'ler genel yapı ve aktif bölgelerinin özellikleri açısından birbirlerine çok benzemelerine rağmen beta laktam ajanlara bağlanma ve hidroliz edebilme kabiliyetleri değişkenlik göstermektedir. Örneğin VIM-1 ve VIM-2 yapısal olarak benzer ancak VIM-2, VIM-1'e göre IPM'ye altı kat daha yüksek afiniteye sahiptir. Bu durum aktif bölgelerindeki aminoasit farkından kaynaklanmaktadır (59).



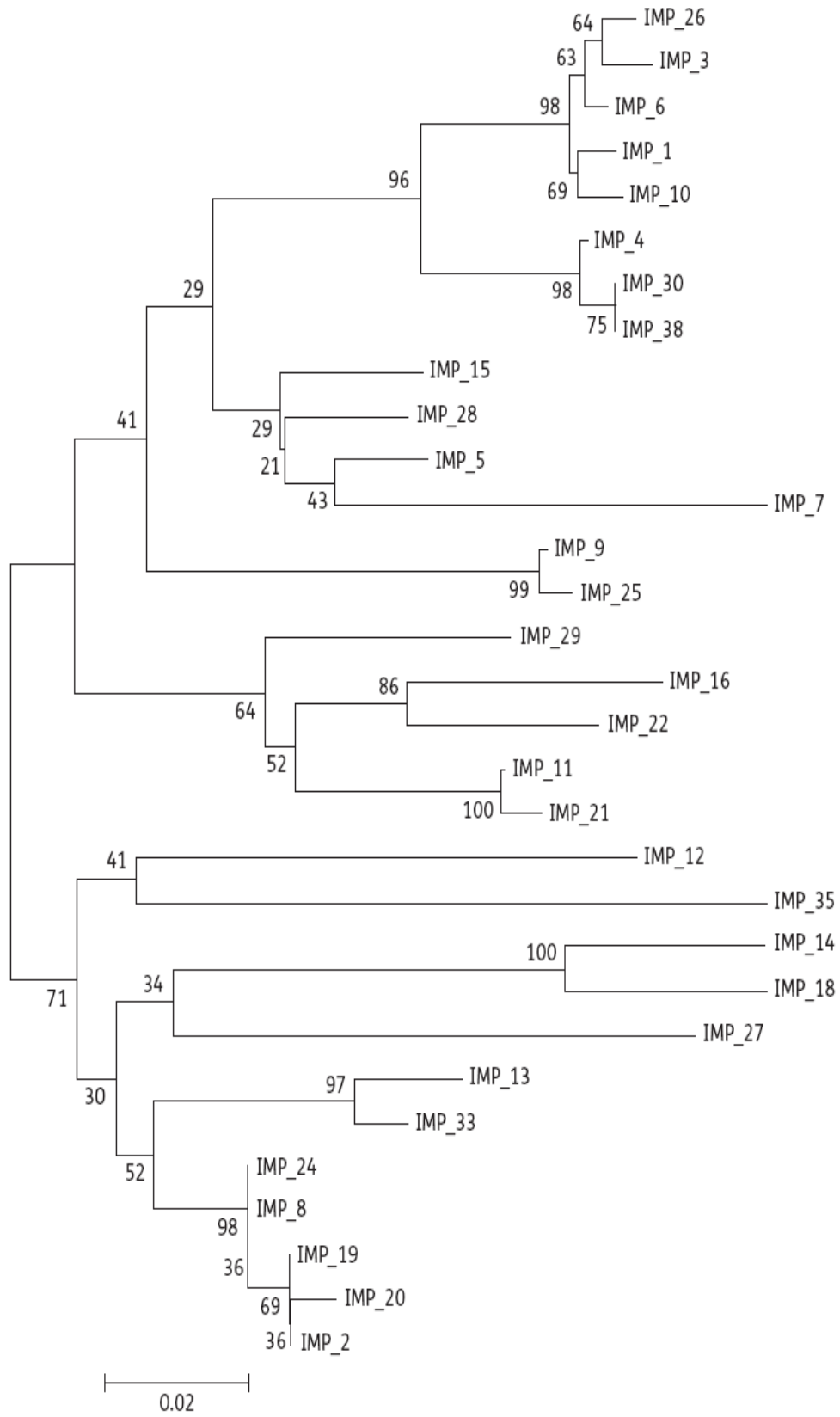
Şekil 1. Metallo beta laktamaz enzimlerinin dünya çapında dağılımı (58)

İlk MBL enzimi olan IMP-1, 1988 yılında, Japonya'da bir *P. aeruginosa* kökeninde tespit edilmiştir (57). 1990'lı yılların başlarında Japonya'da, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) kökenlerinde IMP-1 tipi MBL bildirimi yapılmıştır. 1992-1994 yılları arasında yapılan bir araştırmada ise Japonya'da 17 hastanenin 5'inde IMP-1 enzimi taşıyan *P. aeruginosa* kökenleriyle karşılaşmıştır (60,61). Ayrıca, daha önce Japonya'ya seyahat öyküsü olmayan hastada izole edilen *K. pneumoniae* kökeninde IMP-1 tipi MBL Singapur'dan bildirilmiştir ve bu direnç geninin Japonya özgü olmadığı anlaşılmıştır (62). Daha sonraki yıllarda farklı ülkelerde IMP tipi MBL enzimleri taşıyan *Pseudomonas* kökenleri izole edilmiştir. İtalya'da 1997 yılında IMP-2 enzimi, Hong Kong'da 1994-1998 yılları arasında IMP-4 enzimi, 1998 yılında Portekiz'de IMP-5 enzimi, 1995-1999 yılları arasında Kanada'da IMP-7 enzimi bildirilmiştir (58). IMP-8 enzimi, 1998'de Tayvan'da bir *K. pneumoniae*'da sınıf 1 integronda tanımlanmıştır (63). IMP tipi MBL bildirimleri günümüze kadar artan oranlarda bildirilmeye devam etmiştir (Tablo 5) (58,64-

66). MBL genlerini içeren gen kasetleri, mikroorganizmalar arası transferinde plazmidler ya da transpozonlar gibi genetik elemanları kullanmaktadır ve diğer HE etkeni olan mikroorganizmalara horizontal gen transferleri bu şekilde olmaktadır (67). Peleg ve ark. (68) Avustralya’da yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* kökeninde saptadıkları IMP-4 enzimini *Serratia marcescens* kökeninde de göstermişlerdir. IMP tipi MBL’ler arasında aminoasit farklılıkları mevcuttur, filogenetik sınıflandırması Şekil 2’de gösterilmiştir.

Tablo 5. İmipenemaz tipi metallo beta laktamazların bulunduğu bakteriler ve ülkeler (58,64-66)

İmipenemaz tipi metallo beta laktamazlar		
Beta-laktamazlar	Bulunduğu bakteri	Bildirilen ülke
IMP-1	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
	<i>A. baumannii</i>	Japonya
	<i>Acinetobacter xylosoxidans</i>	Japonya
IMP-2	<i>A. baumannii</i>	İtalya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-3	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
IMP-4	<i>A. baumannii</i>	Çin
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Çin
IMP-5	<i>A. baumannii</i>	Portekiz
IMP-6	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Kanada
IMP-8	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
	<i>A. baumannii</i>	Çin
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Portekiz
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	Çin
IMP-10	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
	<i>A. xylosoxidans</i>	Japonya
	<i>A. baumannii</i>	Japonya
IMP-11	<i>Enterobacteriaceae</i>	Japonya
	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	İtalya
IMP-13	<i>P. aeruginosa</i>	İtalya
IMP-14	<i>P. aeruginosa</i>	Tayland
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	Meksika
IMP-16	<i>P. aeruginosa</i>	Brezilya
IMP-18	<i>P. aeruginosa</i>	Amerika Birleşik Devletleri
IMP-19	<i>Aeromonas caviae</i>	Fransa
IMP-20	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-21	<i>P. aeruginosa</i>	Japonya
IMP-22	<i>P. aeruginosa</i>	Avusturya
IMP-24	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
IMP-25	<i>P. aeruginosa</i>	Çin
IMP-26	<i>P. aeruginosa</i>	Singapur
IMP-29	<i>P. aeruginosa</i>	Fransa
IMP-35	<i>P. aeruginosa</i>	Hollanda-Almanya sınırında



Şekil 2. İmipenemaz tipi metallo beta laktamazların filogenetik sınıflandırması (66)

Bir diğerk MBL enzimi VIM tipi enzimlerdir. VIM-1 İtalya’da 1997’de bir *P. aeruginosa* kökeninde bulunmuş ve ardından VIM-2 Kore, Fransa ve Yunanistan’dan, VIM-3 enzimi Tayvan’dan bildirilmiştir (69). VIM ailesinden enzimler, Avrupa’da *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde tanımlanmıştır. Günümüzde 20’den fazla farklı VIM türleri bilinmektedir (58).

Ülkemizden Yakupoğulları ve ark.’ı (6) kistik fibrozis hastası olan iki yaşındaki çocuktan izole edilen çoklu ilaç direncine sahip *P. aeruginosa* kökeninde VIM-2 tespit etmişlerdir. VIM-2, VIM-1 enzime %90 aminoasit benzerliği ile yakın olarak ilişkilidir. 2001 yılında Yunanistan’dan VIM-4 enzimi taşıyan, aztreonam dışında bütün beta laktamlara dirençli *P. aeruginosa*, IPM tedavisi almış bir hastadan izole edildi (70). Yunanistan’dan İsviçre’ye sevk edilen bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa* kökeninde VIM-4 enzimi tespit edildi (71).

Verona imipenemase tipi enzimlerde integronda taşındığından horizontal olarak yayılmaktadır. Luzzaro ve ark. (72) 2002 yılında İtalya’da *K. pneumoniae* ve *E. cloacae* kökenlerinde aynı MBL genini tespit etmişlerdir. VIM-1’den 5 aminoasit değişikliği (A130K, H224L, E225A, S228R, K291T) ile ayrılan VIM-5, ilk olarak Türkiye *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* kökenlerinde izole edilmiştir. İzole edilen bu kökenlerin karbapenem MİK değerleri yüksek bulunmuştur (3). Kolombiya’da *P. aeruginosa* kökenlerinde tespit edilen VIM-8, İngiltere’ de saptanan VIM-9 ve VIM-10, Arjantin ve İtalya’da saptanan VIM-11 ve birçok ülkeden bildirilen VIM-varyant enzimlerin sayısı günümüzde 27’ye ulaşmıştır (Tablo 6).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda saptanan VIM-26, VIM-1’den 224. konumda bir aminoasit mutasyonu (His224Leu) gösteren yeni bir varyanttır (73). VIM-27 ise, Yunanistan’da *K. pneumoniae* kökeninden izole edilen VIM-1’in bir varyantıdır (Ala57Ser) ve sınıf 1 integronda taşınmaktadır (74).

Tablo 6. Verona imipenemase tipi metallo beta laktamazların bulunduğu bakteriler ve saptandığı ülkeler (58,73,74)

Verona İmipenemase tipi beta-laktamazlar		
Beta-laktamazlar	Bulunduğu bakteri	Bildirilen ülke
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	İtalya
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Fransa
	<i>A. baumannii</i>	Yunanistan
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	Fransa
	<i>A. baumannii</i>	Kore
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
	<i>A. xylosoxidans</i>	Yunanistan
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	Tayvan
	<i>A. baumannii</i>	Tayvan
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	Yunanistan
	<i>Enterobacteriaceae</i>	İtalya
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Macaristan
	<i>A. baumannii</i>	Yunanistan
VIM-5	<i>Enterobacteriaceae</i>	Türkiye
	<i>P. aeruginosa</i>	Türkiye
VIM-6	<i>P. putida</i>	Singapur
VIM-7	<i>P. aeruginosa</i>	Amerika Birleşik Devletleri
VIM-8	<i>P. aeruginosa</i>	Kolombiya
VIM-9	<i>P. aeruginosa</i>	İngiltere
VIM-10	<i>P. aeruginosa</i>	İngiltere
VIM-11	<i>P. aeruginosa</i>	Arjantin
	<i>A. baumannii</i>	Tayvan
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Tayvan
VIM-12	<i>Enterobacteriaceae</i>	Yunanistan
VIM-13	<i>P. aeruginosa</i>	İspanya
VIM-14	<i>P. aeruginosa</i>	İtalya
VIM-15	<i>P. aeruginosa</i>	Bulgaristan
VIM-16	<i>P. aeruginosa</i>	Almanya
VIM-17	<i>P. aeruginosa</i>	Yunanistan
VIM-18	<i>P. aeruginosa</i>	Hindistan
VIM-19	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cezayir
VIM-20	<i>P. aeruginosa</i>	İspanya
VIM-23	<i>Enterobacteriaceae</i>	Meksika
VIM-24	<i>Enterobacteriaceae</i>	Kolombiya
VIM-25	<i>Enterobacteriaceae</i>	Hindistan
VIM-26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	İskandinavya
VIM-27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yunanistan

Hindistan'ın başkenti New Delhi'de, 2008 yılında ilk kez NDM-1, İsveçli bir hastada izole edilen çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae*'den tanımlanmıştır (75). NDM-1 taşıyan kökenler üriner sistem enfeksiyonu, sepsis, pulmoner enfeksiyon, peritonit, katater enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonu, ishal gibi geniş alanda enfeksiyona neden olmaktadır (76).

Yapılan çalışmalar plazmid üzerinde taşınan NDM-1'in giderek yayılmakta olduğunu göstermektedir. 2010 yılında NDM-1 tipi direnç *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde kıtalar arası yayılım göstererek epidemiy oluşturmuştur. *E. coli* ve *Klebsiella* türleri dışında *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* ve *Enterobacter cloacae*'da da bildirilmiştir (77). Karbapenemlere %90'ın üzerinde direnç gösterebilen NDM-1, Hindistan'da bazı kökenlerde tigesiklin ve kolistin direncide göstererek tüm antibiyotiklere dirençli olarak tanımlanmıştır (78). Balkan ülkelerinden yapılan bir çalışmada böbrek transplantasyonu için Pakistan'a giden hastalarda NDM-1 bildirilmiştir (79). Jovic ve ark.'nın (80) 2011 yılında yayınlanan çalışmasında, NDM-1 pozitif *P. aeruginosa* kökeni Sırbistan'da batın içi abse nedeniyle hastanede yatış öyküsü olan 61 yaşında bayan hastanın idrarından izole edilmiştir. Körfez bölgesinde, NDM-1 ilk olarak Umman, Irak, daha yakın zamanda Kuveyt ve Lübnan'dan da *K. pneumoniae* kökenlerinden bildirilmiştir (81).

Ülkemize NDM-1 direnci Irak'tan allojenik hematopoietik kök hücre nakli için transfer edilen 16 yaşında lösemili bir hastadan çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae* kökeninde saptanmıştır (82). Yapılan bir çalışmada dünya genelinde pek çok ülkeden 200'ün üzerinde NDM-1(+) olgu bildirimi yapılmıştır (76).

Son yıllarda NDM varyant enzimlerin sayısı da artmaktadır. 2011 yılında yayınlanan çalışmada Mısır'da bulunan bir hastaneden Almanya'ya transfer edilen bir hastada NDM-2 pozitif *A. baumannii* kökeni tespit edilmiştir (83). Bir diğer çalışmada, İsrail'de *A. baumannii* kökeninden NDM-2 saptanmıştır. Hastaların daha önce Hindistan ve çevresine seyahat öyküsü veya hastanede yatış öyküsü bulunmamaktadır. NDM-2'nin NDM-1'den farkı 28. konumda prolinin yerine alanin aminoasidinin yerleşmesidir (84). 2010 yılında Hindistan'da bir hastanın idrar kültüründen izole edilen *E. coli* kökeninde NDM-4 tipi MBL saptanmıştır. NDM-1'den tek aminoasit değişikliği (Met154Leu) ile, NDM-2'den iki aminoasit değişikliği (Ala28Pro and Met154Leu) ile farklıdır. Karbapenemaz aktivitesi yüksektir, karbapenemlere yüksek düzeyde direnç göstermektedir (85). Hindistan'daki bir tıp merkezinde 6 hafta kaldıktan sonra İngiltere'ye sevk edilen herpes simpleks ensefalitli 41 yaşındaki bir hastadan NDM-5 enzimine sahip *E. coli* ST648 kökeni izole edilmiştir. NDM-5 mevcut enzimlerden 88. konumda (Val3Leu) ve 154. konumdaki (Met3Leu) değişimler nedeniyle farklıdır (86).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, 2009-2010 yılları arasında Yeni Zelanda'da NDM-1 ve NDM-6 üreten *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler (2 adet *E. coli*, 1 adet *K. pneumoniae*, 1 adet *Proteus mirabilis*) 4 hastada izole edilmiştir. NDM-6, NDM-1'den nokta mutasyonu (698. konumda C yerine T) ile farklılık göstermektedir. Dikkat çekici olan dört hastanın hepside Hindistan'dan Yeni Zelanda'ya yakın zamanda dönüş yapmış ve Hindistan'da hastanede yatış öyküsü olan veya sağlık hizmeti almış kişilerdir (87).

Bir diğer MBL enzimi olan SPM-1 Brezilya'da akut lenfoblastik lösemisi olan, febril nötropeni ile başvuran ve daha sonra septik şok nedeniyle hayatını kaybeden bir çocuktan izole edilen yalnızca kolistin duyarlı bir *P. aeruginosa* kökeninden identifiye edilmiştir (88). SPM-1 daha sonra Brezilya'da yaygınlaşmıştır, bazı hastanelerde endemik hale geldiğini gösteren veriler vardır (89). IMP ve VIM'den farklılık gösteren yeni bir MBL'dir. SPM-1, IMP-1 ile %35. 5 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. SPM-1, IMP ve VIM benzeri enzimler gibi transpozon ya da integronlar içinde yer almamaktadır, 180 kb büyüklüğünde bir plazmid ile taşındığı belirtilmektedir ve SPM-1 bilinen tek SPM türevi enzimdir (90).

İlk kez Almanya'da, 2002 yılında yapılan çalışmada, karbapenem dirençli bir *P. aeruginosa* kökeninde GIM-1 tipi MBL bulunmuştur. Yeni bir MBL türü olan GIM-1 daha önce tanımlanan diğer dört MBL türünden farklı olmakla birlikte, IMP-1 varyantları ile %39-43 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. GIM-1'in IPM ve MEM'ye etkisi eşit orandadır. GIM-1 dışında başka GIM türevi enzim bulunmamaktadır (56). GIM-1'i kodlayan genler integron içinde taşınmaktadır. GIM-1, VIM benzeri enzimlerle ortalama %31.2 ve SPM-1 ile %28 homoloji göstermektedir. GIM-1 enzimini kodlayan genlerin bulunduğu integron 45 kb büyüklüğünde bir plazmid ile taşınmaktadır. Bu integronda ayrıca iki aminoglikozid direnç geni (aacA4 and aadA1) ve OXA-2 enzimini kodlayan gen kaseti de bulunmaktadır (91).

Güney Kore'de bir hastanın balgam kültüründen izole edilmiş olan *A. baumannii* kökeninde ilk kez SIM-1 tipi MBL tanımlanmıştır. SIM-1 üreten izolatlar IPM ve MEM için nispeten düşük MİK (8-16g /mL) değerine sahiptir (92). SIM-1 bilinen tek SIM türevi enzimdir.

İlk DIM-1 tipi MBL Hollanda'da *Pseudomonas stutzeri* kökeninden izole edilmiştir. Sınıf 1 integrona gömülmüş DIM-1 aztreonam hariç, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve karbapenemleri önemli ölçüde hidrolize eder. İlk AIM-1 tipi MBL enzimi de Avustralya'da *P. aeruginosa* kökeninde tespit edilmiştir (93). KHM-1 ise, 1997 yılında Japonya'da Kyorin Üniversitesi Hastanesi'nde kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu olan hastadan üretilen *Citrobacter freundii*'den izole edilmiştir (94). Çoğu beta-laktam antibiyotiğe dirençlidir. Libya'nın Tripoli Merkez Hastanesi'nde DIM-1 ve GIM-1 tipi MBL ile benzerliği yüksek

olan sınıf 1 integronda taşınan TMB-1 tipi MBL, *Achromobacter xylosoxidans* kökenlerinde saptanmıştır. Son olarak İtalya Floransa'dan bildirilen, FIM-1 tipi MBL vasküler greft enfeksiyonu olan bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa* kökeninde saptanmıştır. FIM-1 en yüksek benzerliği NDM tip enzimlere göstermektedir (95).

METALLO BETA LAKTAMAZLARIN TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Metallo Beta Laktamazların Tanısında Kullanılan Fenotipik Testler

Metallo-beta-laktamaz enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanması için Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları'nda çeşitli fenotipik yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlar Modifiye Hodge Testi (MHT), Kombine Disk Difüzyon Testi (KDDT), Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST), MBL E-testi kullanılan tarama testleridir.

1. Modifiye Hodge testi: İmipenem duyarlı *E.coli* ATCC 25922'nin MBL üreten bakteri ile birlikte bulunduğu IPM varlığında da üreyebilmesi esasına dayanan bir testtir (96). KPC, OXA ve MBL gibi enzimlerin hepsini birden tespit etmesi ile uygulaması kolay, kullanışlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır ancak enzimlerin ayırımını ortaya koyamaması nedeniyle özgüllüğü düşüktür ve kişiselleşebilecek bir yöntem olması testi yorumlarken güçlüklerle neden olabilir (97).

2. Kombine disk difüzyon testi: MBL aktivitesinin EDTA veya 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatör ajanlarla bloke edilmesi ve IPM inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişlemesi esasına dayanır. Plak içine 2 adet IPM diski yerleştirilir. Bir tanesine EDTA eklendikten sonra ki inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirmenin yapıldığı testtir. 0.1 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 4 mm, 0.5 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif bakteri izolatu kabul edilmektedir (98).

3. Çift disk sinerji testi: KDDT'de olduğu gibi IPM inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişlemesi beklenir. İmipenem diski ve merkezinden 10-20 mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilir, üzerine 0.5 M EDTA eklendikten sonra IPM diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir (99).

4. Metallo beta laktamaz E-test: Test stribinin bir tarafında IPM diğer tarafında ise IPM ve EDTA bulunmaktadır. IPM/IPM-EDTA MİK değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri izolatu olarak değerlendirilir (100).

Metallo Beta Laktamazların Tanısında Kullanılan Genotipik Yöntemler

Belirli primerler kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile MBL geni araştırılabilmektedir. Bunun dışında ısı döngüleri benzer veya birbirlerine yakın primerler kullanarak yapılan Multipleks PZR *Pseudomonas*'larda IMP, VIM, SPM-1, GIM-1, SIM-1 tipi MBL enzimlerinin tek bir PZR ortamında saptanabilmesine olanak sağlamaktadır (101).

Moleküler yöntemlerin altın standardı ise sekans analizi ve klonlama yöntemleridir. Saptanan enzimlerin sınıflandırılmasında sekans analizi kullanılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2011/08.09 sayılı onayı alınarak gerçekleştirildi (Ek 1).

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (Hastanesi) Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'ne Haziran 2011- Haziran 2012 tarihleri arasında gönderilen materyallerden izole edilen ve karbapenem grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı / dirençli olduğu kabul edilen 35 adet *P. aeruginosa* kökeni incelendi.

AKIŞ ŞEMASI

1. *P. aeruginosa* kökenlerinin tanımlanması,
2. Tanımlanmış olan kökenlere disk difüzyon testi ve IPM E test uygulanması,
3. Metallo beta laktamazların fenotipik olarak tanımlanması,
4. Deoksiribonükleik asit izolasyonu,
5. Metallo beta laktamazların genotipik olarak tanımlanması.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA KÖKENLERİNİN TANIMLANMASI

Hastanemizin çeşitli kliniklerinden gönderilen materyallerden izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerinin tanımlanmasında, VİTEK 2 (Biomérieux, France) tam otomatize sistem ve klasik identifikasyon yöntemlerini kapsayan gram boyama, oksidaz testi, fermentasyon testleri yapıldı. Gram boyama sonucu gram negatif reaksiyon veren, oksidaz testi pozitif ve nonfermentatif mikroorganizmalar *P. aeruginosa* olarak tanımlandı (9). Bu kökenlerden VİTEK 2 otomatize sistemi ile IPM ve/veya MEM orta duyarlı veya dirençli olduğu görülenler çalışmaya dahil edilmek üzere ayrıldı.

Ancak disk difüzyon yöntemiyle IPM'ye orta duyarlı veya dirençli bulunan ve IPM E-testi ile MİK değerleriyle doğrulanan kökenler çalışmaya dahil edildi. Hastaların farklı materyallerinden karbapenem dirençli *P. aeruginosa* identifiye edilmesi durumunda tek materyali çalışmaya dahil edildi. Çalışma gününe kadar izolatlar boncuklu saklama besiyerlerinde -80°C 'de saklandı. Standart köken olarak, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Pozitif kontrol olarak VIM-1, VIM-2, IMP-13, SPM-1, NDM-1 tipi MBL üreten *P. aeruginosa* kökenleri kullanıldı. VIM-1, VIM-2, SPM-1, NDM-1 tipi MBL enzimleri üreten *P. aeruginosa* kökenleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zerrin AKTAŞ'tan, IMP-13 tipi enzim üreten *P. aeruginosa* kökeni İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'den ve emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN'dan temin edildi.

KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR LİSTESİ

1. Mueller-Hinton agar besiyeri (MHA) (Merck, Almanya)
2. Mueller-Hinton Broth (MHB) (Merck, Almanya)
3. Antibiyotik diskleri: IPM (10 μg), MEM (10 μg), CAZ (30 μg) (Oxoid, İngiltere)
4. Etilendiamintetra asetik asit (Sigma, Almanya)
5. Cryobank saklama besiyeri (Mast Diagnostik, Almanya)
6. IPM E-test şeritleri (Biomerieux, Fransa)
7. E test MBL şeritleri (Biomerieux, İsveç)
8. Primerler (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM) (Biomatix, Kanada)
9. Taq DNA Polimeraz 1500 Ü (Fermentas, ABD)
10. dNTP mix 10 mM (Fermentas, ABD)
11. Etidyum bromid (Sigma, Almanya)
12. DNA ladder (Fermentas 100 bp ölçekli)
13. Jel yükleme tamponu (Fermentas, ABD)
14. Agaroz (Sigma, Almanya)
15. Isı döngü cihazı (iCycler iQ Real Time PCR, ABD)
16. Elektroforez cihazı (Biorad, Almanya)

ETİLENDİAMİNTETRAASETİK ASİT

Ticari olarak hazır elde edilen EDTA'nın 0.5 M solüsyonu hazırlandı. Bunun için 18.61 g disodium EDTA.H₂O tozu 100 ml'lik steril distile suda çözülerek pH 8.0'e ayarlandı.

pH ayarlanırken NaOH kullanıldı. 0.1 M EDTA hazırlamak için 0.5 M EDTA steril distile su ile 1/5 oranında dilüe edildi. MBL inhibitörü olarak IPM/EDTA kombine disk testinde kullanıldı.

P. aeruginosa kökenlerinin antibiyotik duyarlılık testleri ve MBL enzimini saptamak için kullanılan fenotipik testler aşağıda belirtilen gereçler ve yöntemler kullanılarak yapıldı.

KARBAPENEM DİRENCİNİN SAPTANMASI

Disk Difüzyon Yöntemi

Çalışmaya alınan kökenlerin ‘Clinical Laboratory Standards Institute’ kriterlerine göre, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile IPM, MEM ve CAZ sınır değerleri ölçüldü (Tablo 7). 18–20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri kullanıldı. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden MHB’de 0.5 McFarland bulanıklığında (10^8 CFU/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben IPM, MEM, CAZ diskleri birbirinden en az 22 mm uzaklık olacak şekilde besiyeri üzerine yerleştirildi. Bir gece 35°C - 37°C’lik etüvde 18- 20 saat inkübe edildi. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek, IPM ve MEM için ≥ 16 mm, CAZ için ≥ 18 mm ölçülen zon çapları dirençli kabul edildi (102).

Tablo 7. İmipenem, meropenem, seftazidimin disk difüzyon sınır değerleri (102)

	Disk içeriği	Zon çapı (mm)		
		Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
İmipenem, Meropenem	10 µg	≤ 13	14- 15	≥ 16
Seftazidim	30 µg	≤ 14	15- 17	≥ 18

İmipenem E-Test

Disk difüzyon yöntemleri sonucunda IPM dirençli bulunan kökenlerin MİK değerleri IPM E-test ile saptandı (103). Test edilecek bakteri kökenlerinin 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. IPM E-Test stripleri plak üzerine yerleştirildi. 37°C lik etüvde 18-20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. ‘Clinical Laboratory Standards Institute’ kriterlerine göre IPM MİK

değeri için ≥ 16 µg/ml ise dirençli, 8 µg/ml orta dirençli, ≤ 4 µg/ml ise duyarlı olarak değerlendirildi.

METALLO BETA LAKTAMAZIN FENOTİPİK OLARAK TANIMLANMASI

Modifiye Hodge Testi

Test, IPM'ye duyarlı bir bakteri kökeninin, karbapenemaz üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu IPM varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır (96). Bu testte IPM'ye duyarlı bakteri kökeni olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. *E. coli* kökeninin kanlı agardaki taze kültüründen MHB'ye 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu yapıldı. Ardından bakteri süspansiyonunun MHB'de 1:10 sulandırımı yapılarak, steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben besiyerinin merkezine IPM diski yerleştirildi. Test edilecek *P. aeruginosa* kökeninin kanlı agardaki taze kültüründen öze ile bakteri kolonileri toplandı ve IPM diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif, biri negatif kontrol olmak üzere toplam iki izolat çalışılmış oldu. İnokülasyonu takiben plaklar 35°C-37°C'de 18 saat inkübe edildi. *E. coli* kökenine bağlı oluşan inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E. coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.

Kombine Disk Difüzyon Testi

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. Plak içerisine 3 tane IPM diski yerleştirildi. Diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde ayarlandı. IPM disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanan 0.1 M'lık EDTA solüsyonundan, bir diğer IPM diskinin üzerine 0.5 M'lık EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle eklendi. Plak 35°C- 37°C'lik etüvde 18-20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçüldü. 0.1 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 4 mm büyük olması ve 0.5 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 7 mm büyük olması MBL pozitif bakteri kökenleri olarak kaydedildi (98,104).

Çift Disk Sinerji Testi

Metallo beta laktamaz pozitif bakteri izolatlarını tanımlamak amaçlı ÇDST'de, IPM inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğine bakıldı. Bunun için taze

kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. Plak üzerine IPM diski yerleştirildi. EDTA'nın bakterisidal aktivitesi ve kullanılan kökenlerin IPM duyarlılık zon çaplarının değişmesi nedeniyle IPM diskinin merkezinden 20 mm uzaklığına boş disk yerleştirildi. Boş disk üzerine 0.5 M EDTA solüsyonundan 10 µl eklendi. Test sonuçları plaklar 35°C- 37°C'lik etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alındı. İnkübasyon sonrasında IPM diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirildi. Bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları MBL üreten pozitif köken olarak kaydedildi (99).

Metallo Beta Laktamaz E-Test

Ticari olarak bulunan ve MBL enziminin fenotipik tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir testtir. MBL E-test şeritinin bir tarafında giderek azalan konsantrasyonda IPM (256 µg/ml-4 µg/ml), diğer tarafında ise IPM ile birlikte EDTA bulunmaktadır (64 µg/ml-1 µg/ml). IPM+EDTA kısmında IPM konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu (4 µg/ml) sabitti. IPM+EDTA MİK değeri ile IPM MİK değeri arasında en az sekiz kat azalma saptanırsa, test MBL enzimi açısından pozitif kabul edildi. Test edilecek bakteri izolatlarının 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan MHA plaklarına yayıldı. MBL E-Test stripleri plak üzerine yerleştirildi. Etüvde 18-20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. IPM-EDTA MİK değeri ve IPM MİK değeri not edildi. IPM/IPM-EDTA MİK değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri izolatu olarak değerlendirildi (100).

METALLO BETA LAKTAMAZIN GENOTİPİK OLARAK TANIMLANMASI

Metallo beta laktamaz çalışmada disk difüzyon yöntemi ve IPM E-test yöntemi ile IPM dirençli ve orta duyarlı *P. aeruginosa* kökenlerinde PZR yöntemi ile gösterilen primerler kullanılarak araştırıldı (Tablo 8). IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1 direnç genlerinin araştırılmasında multipleks PZR yöntemi kullanıldı.

Deoksiribo Nükleik Asit İzolasyonu

Pseudomonas aeruginosa kökenleri bir gece MHA'da 37°C'de inkübe edildi. Ependorf tüplerine 500 µl steril distile su konuldu, içerisine 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspanse edildi. 95°C'lik ısı bloğunda 10 dakika bekletildi, takiben 13000 g'de 10

dakika santrifüj sonrasında tüpteki üstte kalan sıvıdan 200 µl yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve direkt olarak PZR için kullanılıncaya kadar - 20°C’de saklandı.

Metallo Beta Laktamaz Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması

Pseudomonas aeruginosa’nın MBL üretiminden sorumlu blaVIM, blaIMP, blaSPM, blaGIM, blaSIM gen bölgeleri Multipleks PZR tekniği ile, blaNDM-1 gen bölgesi ise tüm *P. aeruginosa* kökenlerinde tek primer kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltıldı. Çalışmamızda blaNDM-1 gen bölgesinin primer dizileri Zarfel ve ark.’nın (105) yapmış olduğu bir çalışmadan ve blaVIM, blaIMP, blaSPM, blaGIM, blaSIM gen bölgelerinin primer dizileri Woodford’un (101) çalışmasından seçildi (Tablo 8).

Tablo 8. Metallo beta laktamaz üretiminden sorumlu blaVIM, blaIMP, blaSPM-1, blaGIM-1, blaSIM-1, blaNDM-1 gen bölgelerine spesifik primer dizileri

Gen Bölgesi	Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Kaynak
blaIMP (188bp)	F1	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	Woodford 2010
	R1	CCAAACCACTACGTTATCT	
blaSPM-1 (271bp)	F4	AAAATCTGGGTACGCAAACG	
	R4	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
blaVIM (390bp)	F2	GATGGTGTTTGGTCGCATA	
	R2	CGAATGCGCAGCACCAG	
blaGIM-1 (477bp)	F3	TCGACACACCTTGGTCTGAA	
	R3	AACTTCCAACCTTGCCATGC	
blaSIM-1 (570bp)	F5	TACAAGGGATTGCGCATCG	
	R5	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
blaNDM-1 (264bp)	F	ACC GCC TGG ACC GAT GAC CA	Zarfel ve ark. 2011
	R	GCC AAA GTT GGG CGC GGT TG	

İki ayrı PZR çalışması düzenlendi. PZR karışımı steril alanlarda hazırlandı. Her bir gen bölgesi için standart PZR reaksiyon solüsyonunun son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂KCl], MgCl₂, dNTP, primerler, Taq DNA polimeraz ve ekstrakte edilen *P. aeruginosa* DNA’sı konularak hazırlandı (Tablo 9).

Tablo 9. Polimeraz zincir reaksiyonu solüsyonlarının karışımları (101,105)

Malzemeler	Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu	NDM-1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Steril distile su	17 µl	19 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	5 µl
10X PZR tamponu	10 µl	10 µl
dNTP mix (2 mM)	10 µl	10 µl
Primerler (100 pmol/µl)	Karıştırılan primerden 5 µl kullanıldı (Her primerden eşit miktarda karıştırıldı)	1.5 µl (Her birinden)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	1 µl	1 µl
Ekstrakte edilen DNA	2 µl	2 µl
Toplam PZR hacmi	50 µl	50 µl

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat; **DNA:** Deoksiribo nükleik asit

Hazırlanan PZR karışımları her bir örneğe ait numaralı steril 0.2 µl'lik PZR tüplerine 48 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 2'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. blaVIM, blaIMP, blaSPM-1, blaGIM-1, blaSIM-1 gen bölgeleri ve blaNDM-1'in PZR koşulları cihazda sağlandı (Tablo 10,11).

Tablo 10. blaVIM, blaIMP, blaSPM, blaGIM, blaSIM gen bölgelerinin amplifikasyonunda sağlanan koşullar (101)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	25 saniye	30
Primer Bağlanması	52	40 saniye	
Zincir Uzaması	72	50 saniye	
Son Uzama	72	6 dakika	1

Tablo 11. blaNDM-1 gen bölgesinin amplifikasyonunda sağlanan koşullar (105)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Primer Bağlanması	58	30 saniye	
Zincir Uzaması	72	30 saniye	
Son Uzama	72	10 dakika	1

Agaroz Jel Elektroforezi İle Bantların Okunması

Her 50 ml için 1 gr agaroz içeren %2'lik agaroz jel 0.5xTBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponu içerisinde eritilerek hazırlandı, içerisine 6 µl etidyum bromür (10µg/ml) ilave edildi ve elektroforez tankına dökülerek katılaştırıldı. Elektroforez tamponu olarak 0.5xTBE kullanıldı. Elektroforez için 10 µl PZR ürünü ve 3 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi, her elektroforez izleminde örneklerle beraber DNA markırı da (100 bp DNA) jelde 100 Volt, 400 Amperde, 60 dakika yürütüldü. Jeldeki amplifikasyon ürünleri ultraviyole transillüminatör ile gözlemlendi. Oluşan bantlar 'Gel-doc' sistemi yardımıyla bilgisayarda görüntülendi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistik analiz, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Bilgisayar Laboratuvarı'nda lisans numarası 10240642 olan SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. İstatistik analizlerde kategorik veriler ki-kare test istatistiği ile incelendi ve $p < 0.05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

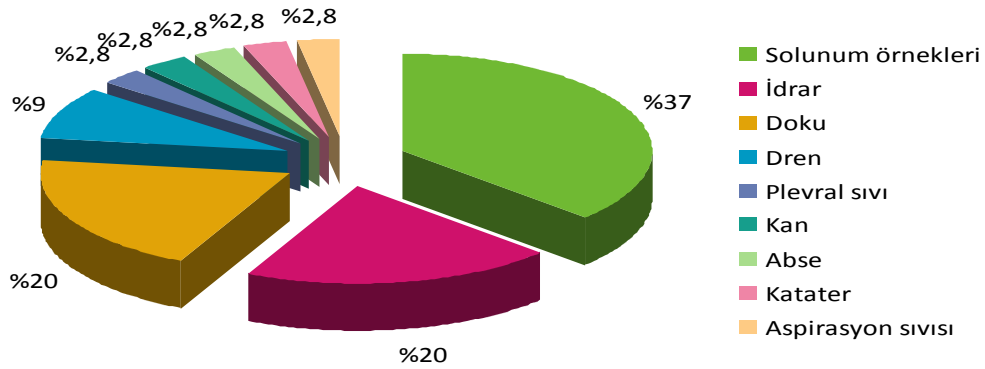
BULGULAR

KÖKENLER

Pseudomonas aeruginosa kökenlerinin %48.5'i YBÜ' den, %31.4'ü cerrahi, %20'si dahili kliniklerden geldi (Tablo 12). Kökenlerin %37'si solunum örneklerinden (endotrakeal aspirat, balgam), %20'si idrardan, %20'si dokudan, %9'u drenenden, %2.8'i plevral sıvıdan, %2.8'i kandan, %2.8'i apsedan, %2.8'i kataterden, %2.8'i aspirattan izole edildi (Şekil 3).

Tablo 12. Materyallerin gönderildiği kliniklere göre dağılımları

Gönderildiği Klinik	Sayı (n)	Yüzde (%)
Yoğun Bakım Üniteleri (Dahili Yoğun Bakım, Cerrahi Yoğun Bakım, Kalp Damar Cerrahi Yoğun Bakım, Reanimasyon, Çocuk Yoğun Bakım)	17	48.5
Dahili Klinikler (Genel Dahiliye, Nöroloji, Göğüs Hastalıkları)	7	20
Cerrahi Klinikler (Genel Cerrahi, Üroloji)	11	31.4
Toplam	35	100

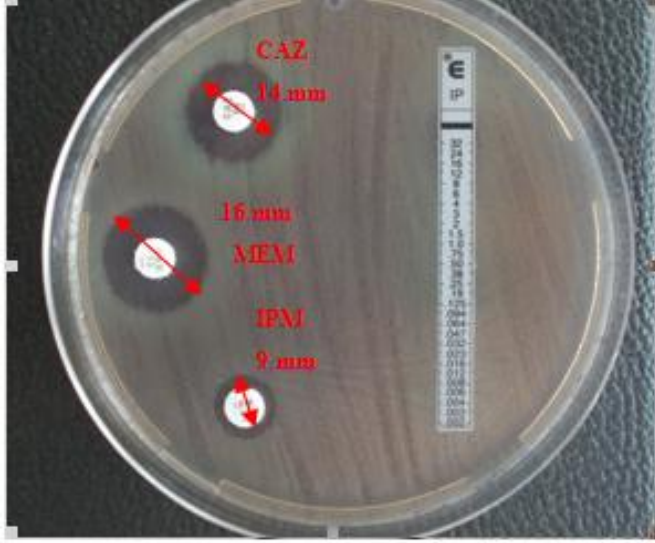


Şekil 3. İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin klinik örneklere göre dağılımı

KARBAPENEM DİRENCİNİN SAPTANMASI

Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Pseudomonas aeruginosa kökenlerinde disk difüzyon yöntemiyle IPM, MEM ve CAZ duyarlılık zonları ölçüldü. IPM MİK değerleri IPM E- test ile belirlendi (Şekil 4). IPM direnci, MEM ve CAZ'ye göre yüksekti. Bu kökenlerin %74.2'si MEM'e, %88.5'i CAZ'ye duyarlı olarak saptandı (Tablo 13).



Şekil 4. İmipenem dirençli (MİK>16), meropenem duyarlı, seftazidim dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökeni

Tablo 13. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin duyarlılık oranları

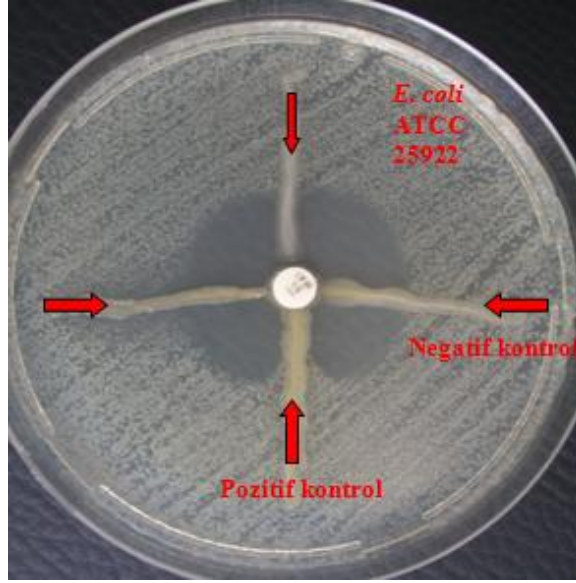
	<i>P. aeruginosa</i> (n=35)		
	Dirençli (%)	Orta duyarlı (%)	Duyarlı (%)
IPM	26 (74.2)	9 (25.7)	0
MEM	5 (14.2)	4 (11.4)	26 (74.2)
CAZ	4 (11.4)	0	31 (88.5)

IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; n: Sayı.

METALLO BETA LAKTAMAZİN FENOTİPİK OLARAK TANIMLANMASI

Modifiye Hodge Test

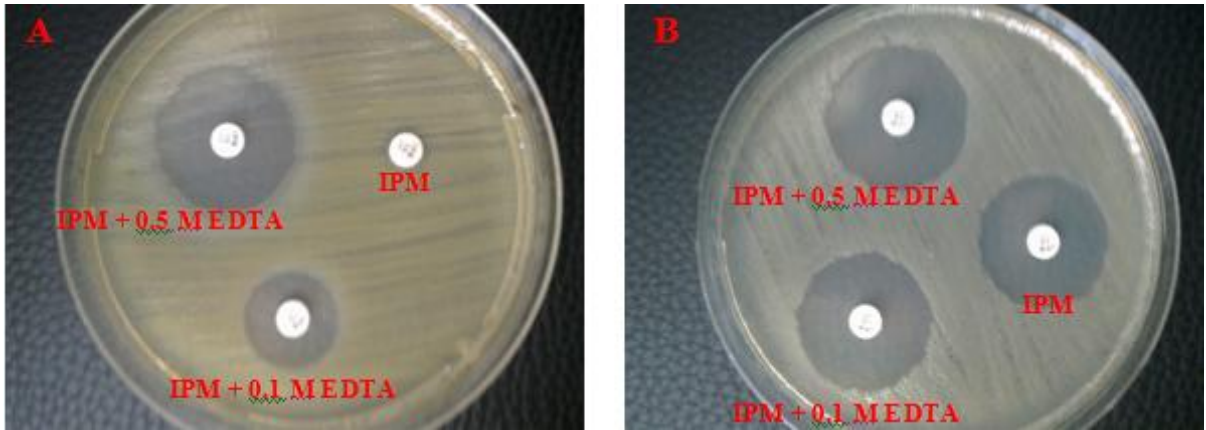
Çalışmaya alınan 35 kökenin tümü (%100) MHT ile MBL negatif bulundu (Şekil 5).



Şekil 5. Modifiye Hodge test negatif kökenler

Kombine Disk Difüzyon Testi

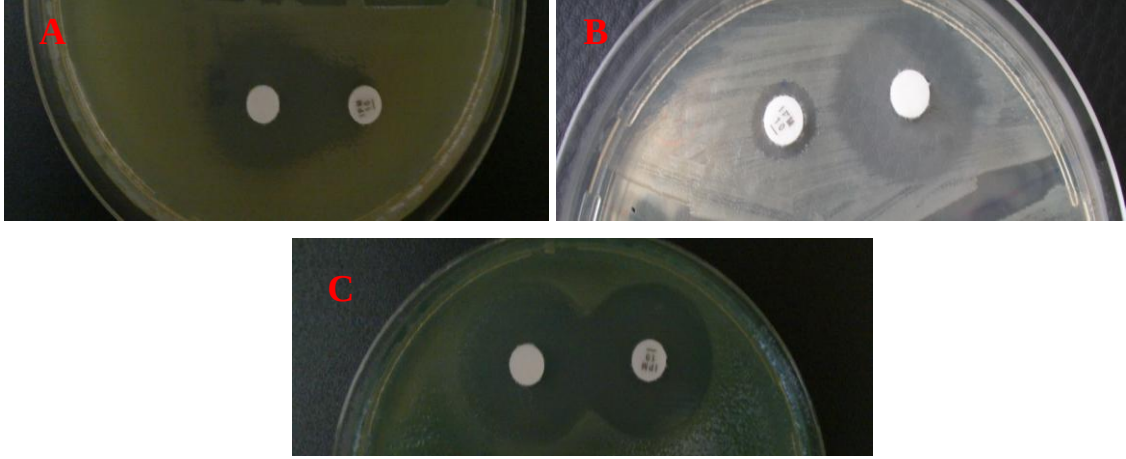
İmipenem + 0.1 M EDTA ile yapılan testte 35 *P. aeruginosa* kökeninin 13'ü (%37.1), IPM + 0.5 M EDTA ile yapılan testte 33'ü (%94.2) fenotipik olarak MBL pozitif saptandı. Her iki deneyde de pozitif olan 13 (%37.1) köken, negatif olan 2 (%5.7) köken saptandı (Tablo 14) (Şekil 6).



Şekil 6. Kombine disk difüzyon testi sonucu: A- pozitif, B- negatif

Çift Disk Sinerji Testi

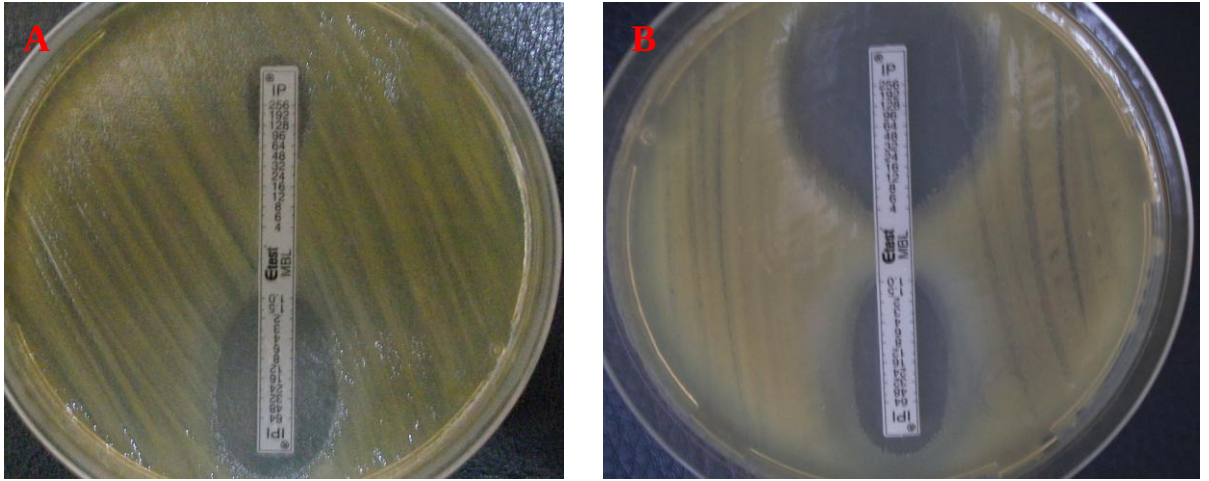
Çalışmaya alınan 35 kökenin 15'inde (%42.8) IPM diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlediği görüldü ve MBL pozitif kabul edildi. 20 kökende (%57.1) sonuç negatif olarak bulundu (Tablo 14) (Şekil 7).



Şekil 7. Çift disk sinerji testi sonucu: A: pozitif, B-C: negatif

Metallo Beta Laktamaz E-test

Çalışmada kökenlerin 19'unda (%54.2) IPM/ IPM+EDTA MİK oranları ≥ 8 olarak bulundu. MBL pozitif olarak değerlendirildi. 35 kökenin 16'sı (%45.7) ise MBL negatif olarak değerlendirildi ve fenotipik olarak MBL üretmediği saptandı (Tablo 14). MBL E-test ile MBL üreten ve üretmeyen kökenler Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8. Metallo beta laktamaz E-test sonucu: A- pozitif, B- negatif

Fenotipik Testlerin Karşılaştırılması

Fenotipik testler MBL E test ile karşılaştırıldığında, ÇDST (%80) ve 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT (%76) duyarlılığı yüksek bulunmuştur (Sırasıyla $p=0.008$, $p=0.03$) (Tablo 15).

P. aeruginosa kökenleri, saptandığı materyaller, gönderildiği klinikler ve bu kökenlerin belirlenen fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 14. Fenotipik yöntemler ile metallo beta laktamaz pozitifliği ve negatifliği

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=35)	
Fenotipik yöntemler	MBL (+) n (%)	MBL (-) n (%)
KDDT		
□ IPM + 0.1 M EDTA	13 (37.1)	22 (62.8)
□ IPM + 0.5 M EDTA	33 (94.2)	2 (5.7)
ÇDST	15 (42.8)	20 (57.1)
MHT	0	35 (100)
MBL E Test	19 (54.2)	16 (45.7)

MBL: Metallo beta laktamaz; **KDDT:** Kombine disk difüzyon testi; **ÇDST:** Çift disk sinerji testi; **MHT:** Modifiye Hodge testi; **n:** Sayı.

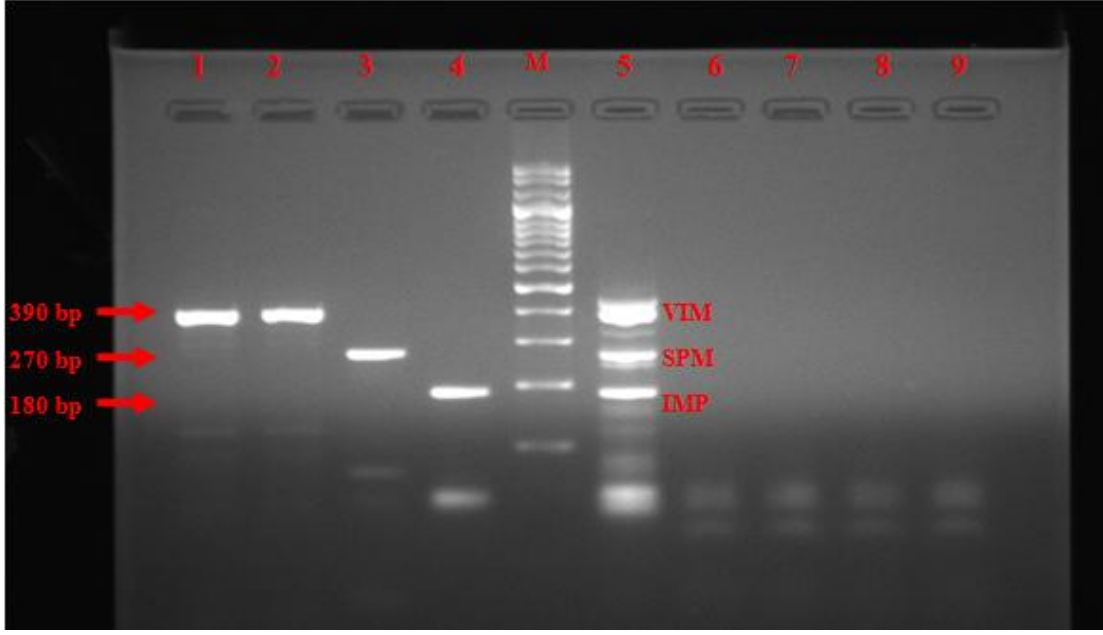
Tablo 15. Çift disk sinerji testinin ve kombine disk difüzyon testlerinin metallo beta laktamaz E-teste göre duyarlılıkları

		Metallo beta laktamaz E- Test		
		(+) (n:19)	(-) (n:16)	Duyarlılık(%)
KDDT (0.1M EDTA)	(+) (n:13)	10	3	%76.9 (p: 0.03)
	(-) (n:22)	9	13	
KDDT (0.5M EDTA)	(+) (n:33)	19	14	%57.57 (P> 0.05)
	(-) (n:2)	0	2	
ÇDST	(+) (n:15)	12	3	%80 (p: 0.008)
	(-) (n:20)	7	13	

ÇDST: Çift disk sinerji testi; **KDDT:** Kombine disk difüzyon testi; **n:** Sayı.

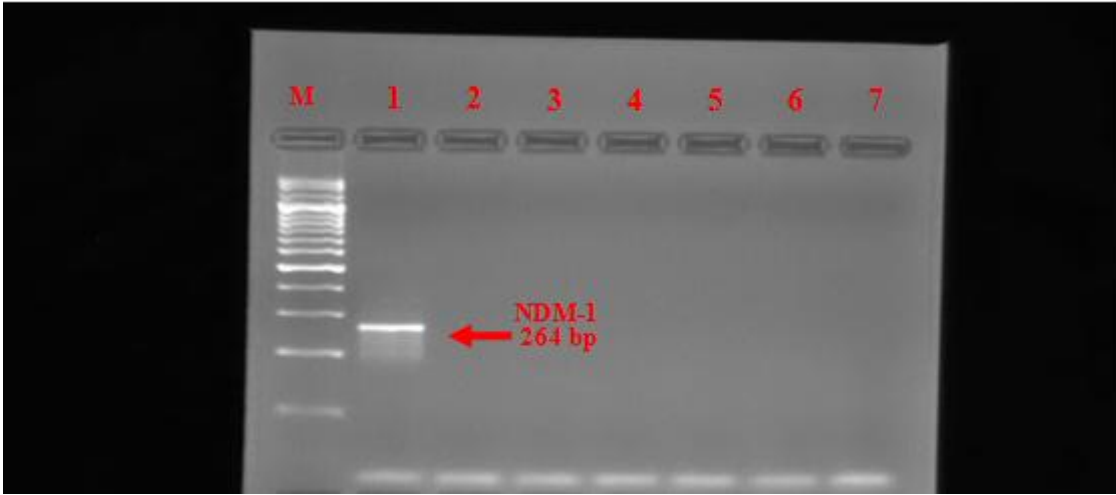
METALLO BETA LAKTAMAZIN GENOTİPİK OLARAK TANIMLANMASI

Pseudomonas aeruginosa kökenlerinin tümünde yapılan PZR ve Multipleks PZR yöntemleri sonucunda MBL üretiminden sorumlu NDM-1, IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1 enzimleri negatif bulunmuştur (Şekil 9,10). Multipleks PZR'nin çalıştığını göstermek amaçlı IMP-13, VIM-1, VIM-2, SPM-1 pozitif kontrolleri teker teker ve birlikte çalışıldı. SIM-1 ve GIM-1 MBL enzimleri henüz ülkemizde de saptandığı bildirilmediğinden çalışmada kullanılmadı.



1-5: Pozitif kontrol, 1: VIM-1, 2:VIM-2, 3:SPM-1, 4:IMP-13, 5:VIM-1, VIM-2, SPM-1, IMP-13 pozitif kontrollerinin karışımı, M: Ladder 100bp, 6-8: Araştırılan kökenler, 9: Negatif kontrol.

Şekil 9. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi



M: Ladder 100bp, 1: NDM-1 pozitif kontrol, 2-6: Araştırılan kökenler, 7: Negatif kontrol.

Şekil 10. NDM-1 genine ait polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Tablo 16. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin fenotipik ve genotipik özellikleri

Köken Sıra no	Protokol no	Klinikler	Materyal	Antibiyogram Sonuçları				Fenotipik Test Sonuçları					Moleküler Sonuçlar
				Disk diffüzyon zon çapları			IPM E-test MİK(µg/ml)	KDDT		MBL E-test	ÇDST	MHT	
				IPM	MEM	CAZ		0.1 M EDTA	0.5 M EDTA				
1	3442799	YBÜ	İdrar	R	I	S	16	+	+	-	-	-	-
2	3468105	YBÜ	Balgam	I	S	S	6	-	-	-	-	-	-
3	3487561	YBÜ	ETA	I	S	S	6	-	+	-	-	-	-
4	3488118	Plastik Cerrahi	Doku	R	S	S	24	-	+	+	-	-	-
5	3495556	Nöroloji	Balgam	R	I	S	32	+	+	+	+	-	-
6	3508032	Dahiliye	Aspirat	R	S	S	8	-	+	+	+	-	-
7	3507331	Ortopedi	Doku	I	I	R	6	-	+	-	-	-	-
8	3527831	YBÜ	ETA	R	S	S	32	+	+	+	-	-	-
9	3581340	Üroloji	İdrar	I	S	S	6	-	+	-	-	-	-
10	3587611	YBÜ	iv. katater	R	S	S	32	+	+	-	-	-	-
11	3593792	YBÜ	Balgam	R	I	S	16	-	+	+	+	-	-
12	3596124	Plastik Cerrahi	Doku	R	S	S	16	-	+	+	+	-	-
13	3596129	YBÜ	İdrar	R	S	S	16	-	+	+	-	-	-
14	3614433	YBÜ	ETA	R	S	S	16	-	+	+	+	-	-
15	3601053	Dahiliye	Balgam	R	S	R	24	-	+	-	-	-	-
16	3615610	Plastik Cerrahi	Doku	R	R	S	16	+	+	+	-	-	-
17	3587988	Genel Cerrahi	Dren	R	R	S	16	+	+	+	-	-	-
18	3689389	Üroloji	İdrar	I	S	S	8	-	+	-	-	-	-

KDDT: Kombine Disk Difüzyon Testi; **ÇDST:** Çift Disk Sinerji Testi; **MHT:** Modifiye Hodge Testi; **IPM:** İmipenem; **MEM:** Meropenem; **CAZ:** Seftazidim; **MİK:** Minimum İnhibitör Konsantrasyon; **YBÜ:** Yoğun Bakım Ünitesi; **ETA:** Endotrekeal aspirasyon; **R:** Dirençli; **I:**Orta duyarlı; **S:** Duyarlı.

Tablo 16. ‘Devam’ *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin fenotipik ve genotipik özellikleri

Köken Sıra no	Protokol no	Klinikler	Materyal	Antibiyoqram Sonuçları				Fenotipik Test Sonuçları					Moleküler Sonuçlar
				Disk diffüzyon zon çapları			IPM E-test MİK (µg/ml)	KDDT		MBL E-test	ÇDST	MHT	
				IPM	MEM	CAZ		0.1 M EDTA	0.5 M EDTA				
19	3696777	Dahiliye	Doku	R	S	S	16	-	+	+	+	-	-
20	3820329	YBÜ	ETA	R	R	S	16	-	+	-	+	-	-
21	3762763	YBÜ	Abse	R	R	S	12	+	+	+	-	-	-
22	3767663	Dahiliye	Kan	R	S	S	12	-	+	-	+	-	-
23	3763325	Plastik Cerrahi	Doku	R	R	S	12	-	+	-	-	-	-
24	3756540	YBÜ	Balgam	R	I	S	16	+	+	+	+	-	-
25	3806350	Dahiliye	Plevral sıvı	I	S	S	6	-	+	-	-	-	-
26	3749423	Genel Cerrahi	Dren	R	S	I	32	-	+	+	+	-	-
27	3780811	YBÜ	ETA	I	S	S	6	-	+	-	-	-	-
28	3783623	YBÜ	ETA	R	S	S	16	+	+	-	+	-	-
29	3817928	YBÜ	İdrar	R	S	S	16	+	+	+	+	-	-
30	3810364	Kardiovasküler Cerrahi	Dren	I	S	S	6	-	-	-	-	-	-
31	3845631	YBÜ	ETA	I	S	S	8	-	+	-	-	-	-
32	3837445	YBÜ	İdrar	R	S	S	12	+	+	+	-	-	-
33	3880945	Plastik Cerrahi	Doku	R	S	S	24	-	+	+	+	-	-
34	3891128	YBÜ	ETA	R	S	S	12	+	+	+	+	-	-
35	3902420	Dahiliye	İdrar	R	S	I	32	+	+	+	+	-	-

KDDT: Kombine Disk Difüzyon Testi; **ÇDST:** Çift Disk Sinerji Testi; **MHT:** Modifiye Hodge Testi; **IPM:** İmipenem; **MEM:** Meropenem; **CAZ:** Seftazidim; **MİK:** Minimum İnhibitör Konsantrasyon; **YBÜ:** Yoğun Bakım Ünitesi; **ETA:** Endotrekeal aspirasyon; **R:** Dirençli; **I:**Orta duyarlı; **S:** Duyarlı.

TARTIŞMA

Pseudomonas cinsi bakterilerden özellikle *P. aeruginosa* kökenleri her ortamda bulunabilirler ve daha da önemlisi hastane ortamında da kolay yaşayabilirler, özellikle çoğul antibiyotik direnci kazanmaları nedeniyle HE'ler arasında önemli bir yere sahiptirler. *P. aeruginosa* immün sistemi baskılanmış olanlarda, genel durumu kötü, bilinci kapalı ve uzun süre entübe olan hastalarda, ağır yanıklı kişilerde, malign veya ciddi metabolik hastalığı bulunanlarda, uygunsuz şekilde uzun süre antibiyotik kullananlarda, uzun süre kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda enfeksiyon etkeni olarak önem kazanmaktadır (106,107).

Yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere, HE etkeni olarak en sık izole edilen fırsatçı patojenlerden biridir ve genelde HE'lerin %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (108,109). Hastanemiz verilerinde HE'ler arasında *P. aeruginosa* oranı 2010 yılında %12, 2012 yılında da benzer şekilde %12,8 olarak saptanmıştır (Hastane Enfeksiyonu Kontrol Komitesi yayınlanmamış verileri).

Bu çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* 'lar en sık YBÜ (%48.5) olmak üzere, %31,4'ü cerrahi ve %20'si dahili kliniklerden izole edilen kökenler idi. Bu kökenler en sık solunum örneklerinden (%37), idrardan (%20), dokudan (%20) izole edildi. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da *P. aeruginosa* kökenleri en sık YBÜ'den izole edilmiş olup trakeal aspirat, idrar ve yara yeri gibi klinik materyallerdeki kültürlerinde daha fazla saptanmaktadır (110-112).

Son yıllarda dikkat çekici nokta *P. aeruginosa* kökenlerinde hızla artan karbapenem direncidir. Avrupa'da karbapenem direnç oranları %3.5-%66.7 arasında değişmektedir (26). Kore'de yapılan çalışmalarda IPM direncinin beş yıl içinde %6'dan %19'a ulaştığı saptanmıştır (113,114). Karbapenem dirençli kökenler, örneğin NDM-1 tipi MBL enzimi

taşıyanlar, aynı zamanda diğer antibiyotiklere de dirençli olmaları nedeniyle tedavi seçeneğini kısıtlamaktadır (78).

Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençten birden fazla mekanizma sorumlu olabilmektedir. Kromozomal kaynaklı OprD değişikliği ve aktif eflüks mekanizmalarının yanı sıra aktarılabilen, plazmid kaynaklı MBL üretimine bağlı direnç en yaygın görünenleridir. MBL üreten *P. aeruginosa* kökenleri de son yıllarda enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedir. Bundan dolayı, MBL üreten etkenlerin yayılımının takip ve kontrolü toplum sağlığı açısından önemlidir.

Metallo beta laktamaz varlığını ortaya koymak için KDDT, ÇDST, MHT ve MBL E-test gibi çeşitli fenotipik testler kullanılmaktadır. Fenotipik testler arasında MBL varlığının tespitinde en yüksek özgüllük ve duyarlılığın MBL E-test yöntemi ile ortaya konulduğu bildirilmektedir. Walsh ve ark.'nın (115) yapmış olduğu bir çalışmada, E testin MBL'nin fenotipik tayinindeki duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %95 olarak belirlenmiştir. IPM'ye dirençli 96 adet *P. aeruginosa* kökeninden %36'sında VIM tipi MBL pozitif saptanan başka bir çalışmada ise, MBL E-testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %95'tir (116). Çin'in farklı bölgelerindeki hastanelerden izole edilen, PZR ile doğrulanan IPM dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL E-testin duyarlılığı %85.7 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur (117). Khosravi ve ark.'nın (118) çalışmasında, MBL E-testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %62.1'dir. Pitout ve ark.'nın (119) fenotipik yöntemle 241 *P. aeruginosa* kökeninde %46 oranında MBL pozitif saptadığı çalışmada, MBL E-testin duyarlılığı %96 ve özgüllüğü %91 olarak bulunduğu bildirilmiş, ancak yaptıkları genotipik doğrulamada 12 adet MBL negatif çıkan kökende, MBL E testinde yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıktığı da saptanmıştır. Çalışmamızda, MBL E-testin özgüllük ve duyarlılık yorumları direnç genlerinin gösterilememiş olması nedeniyle yapılamamıştır.

Ülkemizden yapılan çalışmalarda da Öztürk ve ark. (120) YBÜ'den izole edilen IPM dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL E-test ile MBL pozitifliğini % 40, Ulusoy ve ark. (121) %51.9 olarak saptamışlardır. Bayraktar ve ark. (122) karbapenem dirençli *P. aeruginosa* 'larda MBL E test ile MBL pozitifliğini %66.6, Toraman ve ark. (123) ise %29 oranında bulmuşlardır.

Metallo beta laktamaz E-testin dezavantajı, IPM duyarlı izolatlarda MBL tayinine uygun olmaması ve diğer fenotipik testlere göre pahalı olmasıdır. Bu nedenle, MBL E-test ile uyumu yüksek saptanan ve MBL E-teste alternatif ucuz bir test olan KDDT çoğu laboratuvar tarafından kullanılmaktadır (121).

Yan ve ark. (124), KDDT'nin *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL'nin fenotipik tanısındaki duyarlılığının %87, özgüllüğünün ise %96.7 olduğunu bildirilmişlerdir. Oh ve ark. (113) KDDT'nin VIM benzeri enzim üreten kökenlerin fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtmiştir.

Türkiye' de 7 farklı coğrafi bölgeyi temsil eden 8 ilden (Ankara, Konya, Antalya, İstanbul, İzmir, Diyarbakır, Van ve Trabzon) toplam 186 karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* kökeninde MBL'nin varlığı KDDT testi ile araştırılmıştır. Kökenlerin ortalama %31,2'sinde MBL enzimi pozitifliği saptanmıştır. MBL pozitiflik açısından iller en yüksek Antalya (%52), İstanbul (%50), en düşük Diyarbakır (%6) olarak saptanmıştır (125). Demirdağ ve ark.'nın (126) YBÜ'de karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde yaptıkları çalışmada MBL pozitifliği KDDT ile % 79 oranında bulunmuştur. Diğer iki çalışmada ise KDDT ile MBL pozitifliği sırasıyla %56.8 ve %32 oranlarında bildirilmiştir (127,128).

Çalışmamızda da karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde, MBL enzimlerinin varlığını tespit etmek amaçlı beş ayrı fenotipik test çalışıldı. MBL pozitifliği, MBL E-test ile %54.2 iken diğer fenotipik testlerden 0.5 M EDTA'lı KDDT ile %94.2, ÇDST ile %42.8, 0.1 M EDTA'lı KDDT ile %37.1 oranında saptanmıştır. Ancak MHT ile kökenlerin hiçbirinde MBL pozitifliği saptanmadı. Ülkemizdeki ve yurt dışındaki pek çok çalışmada yapılan fenotipik testler yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu belirtilen MBL E-test ile karşılaştırılmaktadır. Çalışmamızda, fenotipik testler MBL E-test ile karşılaştırıldığında, ÇDST (%80) ve 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT (%76) duyarlılık oranları yüksek bulunmuştur (Sırasıyla $p=0.008$, $p=0.03$). Yan ve ark.'nın (124) gram negatif bakterilerde fenotipik yöntemleri karşılaştırdıkları çalışmalarında *Pseudomonas* ve *A. baumannii* kökenleri için ÇDST'nin duyarlılığını KDDT'den daha yüksek olarak tespit etmişlerdir. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* için duyarlılık ve özgüllük oranları, sırasıyla ÇDST'de % 95.7 ve % 95, KDDT'de % 87 ve % 96.7 olarak bulmuşlardır. Lee ve ark. (129) yaptıkları çalışmada ise, ÇDST'nin MBL saptama duyarlılığı *Pseudomonas* kökenlerinde yaklaşık %89, *Acinetobacter* kökenlerinde ise %100'dür.

Çalışmamızda karşılaştırmak amaçlı, Franklin ve ark. (104) tarafından önerilen MBL tespitinde duyarlılığı %100, özgüllüğü %98 olarak saptanan 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT yöntemi de kullanılarak, 0.5 M EDTA ile yapılan KDDT arasındaki fark değerlendirildi. 0.5 M EDTA ile yapılan KDDT'i, 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT'ine göre yüksek oranda MBL pozitifliği saptadığı bulunmuştur. Ayrıca, bu sonuçların moleküler yöntemlerle yapılan doğrulama testlerinin sonuçları ile uyumsuz olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada MHT ile kökenlerin hiçbirinde MBL pozitifliği saptanmadı. Lee ve ark. (96) yaptığı bir çalışmada IPM'ye dirençli olduğu saptanan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* kökenlerinde MHT sonuçlarını IMP hidroliz testi ile karşılaştırdıklarında MHT'nin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 oranında bulmuşlardır. Ancak, Amudhan ve ark. (130) yaptığı bir çalışmada MBL pozitifliğini fenotipik testlerden MHT ile %94.4, KDDT ile %80.4 olarak buldukları *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* kökenlerinde genotipik yöntemle %51.4 oranında VIM ve IMP genlerini tespit etmişlerdir. Ülkemizden yapılan çalışmalarda, Alışkan ve ark. (131) iki yıllık süreçte çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenem direnci şüpheli kökenlerde yapılan MHT sonucunda %1.4 oranında MBL pozitifliği saptamıştır. Mersin'de moleküler yöntemle MBL pozitifliği gösterilen *P. aeruginosa* kökenlerinde MHT ile duyarlılık %54, özgüllük %100 olarak bulunmuştur (7). MHT kolay uygulanabilen bir testtir ancak tek başına kullanıldığında KPC, OXA ve MBL gibi karbapenemazların ayırımını yapamadığından özgüllüğü düşüktür (97). Çalışmamızda fenotipik testler arasından moleküler doğrulama test sonuçları ile en uygun sonuç veren testin MHT olduğu gözükmemektedir. Ancak moleküler yöntemlere göre hiç karbapenemaz genlerine rastlanmadığı düşünülecek olursa, gerçek pozitif kökenlerde MHT'nin değeri daha iyi anlaşılacaktır. Bu çalışmamızda genetik olarak gerçek pozitif köken bulunmadığından karbapenemaz tespitini saptamak amacıyla MHT'nin kullanımı hakkında kesin bir yargıya varılamamıştır.

Metallo beta laktamaz tespiti için fenotipik testler ile tarama yöntemleri ile kesin sonuç elde etmek henüz mümkün değildir. Her ne kadar yapılan çalışmalarda fenotipik yöntemlerle MBL direnci araştırılsa da, sonuçlar moleküler yöntemlerle doğrulanmalıdır. Günümüzde moleküler yöntemlerle MBL üretiminden sorumlu çok sayıda gen bölgeleri tanımlanmıştır. Tanımlamada kullanılan gen bölgelerinin moleküler yöntemlerle araştırılması yaygın olarak kullanılmaktadır. Saptanan gen bölgelerinin dizin analizleri kullanılarak isimlendirme yapılmaktadır.

Metallo beta laktamaz direnç geni ilk olarak 1988'de Japonya'da *P. aeruginosa* kökeninde bildirilmesinden sonra Japonya başta olmak üzere çeşitli Asya ve Avrupa ülkelerinden gram negatif çomaklarda, özellikle *Pseudomonas* kökenlerinde yeni MBL'ler bildirilmiştir. SPM-1 Brezilya'da, GIM-1 Almanya'da ve SIM-1 Kore'de, AIM-1 Avustralya'da, DIM-1 Hollanda'da sınırlı kalmıştır. Son olarak İtalya'da FIM-1 tanımlanmıştır. NDM-1 Hindistan'dan kıtalara yayılırken, VIM tipi MBL'ler dünya çapında yayılmaya devam etmektedir (58,91,95,132).

Birçok Avrupa ülkesinde, çoğunlukla Akdeniz'e komşu ülkelerde, karbapenem dirençli *Pseudomonas*'lar endemik hale gelmiştir. 2001-2002 yılları arasında nozokomiyal *P. aeruginosa*'da en sık karbapenem direnç mekanizması arasında VIM-tipi MBL'ler saptanmıştır (133). VIM-1, ilk olarak İtalya'da *P. aeruginosa*'dan bildirilmiştir, sonrasında Fransa ve Yunanistan'da VIM-2 MBL bildirilmiştir ve VIM enziminin oluşumu hızla devam etmiştir (69). Dünyada en yaygın olan MBL enzimleri VIM-tipi enzimlerdir. Mobil gen kasetleri ile taşınabilen integrona yerleşmiş olan bu direnç genleri, yayılım potansiyeline sahiptir. Transpozonların yapısında bulunan integronlar yer değiştirebilmektedir ve bu durum çeşitli bakteri türleri arasında VIM tipi MBL enziminin yayılması riskini gündeme getirmektedir (32).

Komşularımızdan Yunanistan'da çoğu *P. aeruginosa* kökenlerinde VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-12, VIM-17, son olarak VIM-27 tipi MBL tanımlanmıştır (58,74). Bulgaristan'da VIM-15, VIM-16 tipi MBL bildirilmiştir (134). Diğer komşu ülkelerimizden İran'da da *P. aeruginosa* kökenlerinde VIM tipi MBL bildirimleri mevcuttur (135,136).

Ülkemizde de çoğunlukla VIM tipi MBL genlerini tespit eden çalışmalar mevcuttur. Mersin Üniversitesi'nde yapılan çalışmada 29 *P. aeruginosa* kökeninin 11'inde (%37.9) VIM-1 MBL geni saptanmıştır (7). Hacettepe Üniversitesi'nde 110 *P. aeruginosa* kökeninde yapılan bir çalışmada 11 tanesi VIM tipi MBL enzimi açısından pozitif bulunmuştur (4). Farklı olarak, Özgümüş ve ark. (5) 2007 yılında 100 *P. aeruginosa* kökeninden 9 tanesinde IMP-1, bir tanesinde VIM tipi MBL geni saptamıştır.

Bu çalışmada ise, birbirlerine yakın primerler kullanılarak yapılan multipleks PZR ile *Pseudomonas*'larda IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1 tipi MBL enzimleri araştırıldı (101). İlaveten, NDM-1 direnç genini aramaya yönelik PZR yöntemi çalışıldı. Ülkemizde ve komşu ülkelerde MBL enzimleri değişik oranlarda bildirilmesine rağmen çalışmamızda pozitiflik saptanmamıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde fenotipik testlerle MBL pozitifliği tespit eden ancak PZR ile doğrulamada MBL genlerini negatif olarak bulan çalışmalar da mevcuttur. Aktaş ve ark. (98) KDDT, ÇDST, MBL E-test ile pozitif bulunan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* kökenlerinde blaIMP ve blaVIM genleri açısından pozitiflik tespit etmemiştir. Küçükbasmacı ve ark. (137) multipleks PZR yöntemi ile IPM'ye dirençli veya orta dirençli 51 adet *P. aeruginosa* kökeninde blaIMP ve blaVIM genini saptamamışlardır. Ankara'da 79 *Acinetobacter* kökeni üzerinde yapılan başka bir çalışmada IPM direnci E test ile % 51.9'unun, kombine disk sinerji testi ile % 58.2'sinin, çift disk sinerji testi ile % 55.7'sinin, MHT ile % 69.6'sının MBL ürettiği saptanmış, PZR yöntemiyle blaIMP-1 geni

araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır (121). Benzer şekilde *Acinetobacter* kökenlerinde yapılan bir diğer çalışmada KDDT ile % 51.6'sında MBL pozitif saptanmış, ancak kökenlerde blaIMP-1 ve blaVIM-2 genleri negatif bulunmuştur (138). Türk Dağı ve ark.'nın (139) çalışmasında karbapenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinin % 69'u KDDT ile MBL pozitif saptanmıştır. Ancak PZR ile kökenlerin hiçbirinde blaIMP ve blaVIM genleri saptanamamıştır.

Yapılan çalışmalara bakıldığında fenotipik testler ile MBL enzim varlığı bildirilen bazı kökenlerde moleküler yöntemlerle direnç gen araştırmalarında negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. MBL E-test, KDDT ve ÇDST gibi fenotipik testler MBL'nin EDTA ile inhibisyonu özelliği üzerine tasarlanmıştır. Ancak, yüksek konsantrasyonlardaki EDTA, bakterinin hücre zarı geçirgenliğini arttırabilmektedir ve bakterisidal etkili olabilmektedir. Bu durumda da sonuçlar yanlış pozitiflik gösterebilmektedir (140). Çalışmamızda da moleküler yöntemlerle, yaygın olan 6 adet MBL direnç geni araştırılmış ancak negatif bulunmuştur. Bu sonuç, MBL varlığını tespit eden EDTA ile inhibisyon özelliği üzerine geliştirilmiş fenotipik testlerin yüksek oranda yanlış pozitif sonuç verebileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, Segal ve Elisha'nın (141) yapmış olduğu bir çalışmada, karbapenem dirençli 49 adet *A. baumannii* kökeninin tümünde MBL E-test ile sonuç pozitif olmasına rağmen hiçbirinde blaIMP ve blaVIM tipi MBL genleri saptanamamıştır. Ancak kökenlerin tümünde OXA-23 varlığı gösterilmiştir. Yazarlar, MBL E-test stripleri ile özellikle *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi muhtemel oksasilinaz taşıyan bakterilerde elde edilen sonuçların dikkatli yorumlanması gerektiğini önermişlerdir.

Yapılan pek çok çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL enzimleri dışında karbapenem direncine neden olan mekanizmalar gösterilmiştir. Bunlardan Yunanistan'da yapılan bir çalışmada Maniati ve ark. (33) *Pseudomonas* kökenlerinde yüksek düzey karbapenem direncinde birçok direnç mekanizmasının (VIM-4 tipi MBL, OXA-35, MexAB-OprM ve MexXY-OprM aktif dışa pompalama sistemleri ve porin kaybı gibi) bir arada rol oynadığını göstermişlerdir. Lister ve ark. (34), OprD porin kaybı gibi permeabilite değişikliği ile birlikte MexXY aşırı üretimi durumunda *Pseudomonas* kökenlerinde yüksek düzey IPM direncine yol açtığını ortaya koymuşlardır. Çin'de 28 hastanenin katıldığı karbapenem dirençli 258 *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada da karbapenem direnç mekanizmaları incelenmiş ve dirence neden olan MBL enzimlerine ilave olarak farklı beta laktamazlar saptamışlar ve çalışmaya alınan bütün *P. aeruginosa* kökenlerinde OXA-50 geni, bir *P. aeruginosa* kökenlerinde GES-5 geni saptanmıştır. Ayrıca dış membran porin defektinin de karbapenem direncinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. MBL pozitifliği saptadıkları 22

(%8,5) kökünde ise blaVIM-2, blaIMP-9, blaIMP-1 genleri bulunmuştur. Bunun dışında kökenlerin %79.8'inde OprD mutasyon varlığını göstermişlerdir (142). Bir diğer benzer çalışma da Mac Aogáin ve ark.'nın (143) *P. aeruginosa* kökenlerinde direnç mekanizmaları ile ilgili yaptıkları çalışmada IPM dirençli kökenlerin yaklaşık %85'inde oprD porin kaybı gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinde genotipik yöntemlerle MBL genlerinin negatif saptanması nedeniyle, çalışmalarda da gösterildiği gibi karbapenem direncinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir. Fenotipik testlerden tüm karbapenemaz enzimlerinin varlığını gösteren MHT'nin negatif bulunması, kökenlerin diğer karbapenemaz enzimlerini de taşımadığını düşündürmektedir ancak kesin sonucun moleküler yöntemlerle elde edilebileceği de ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu durumda karbapenem direncinde dış membran porin defekti veya aktif dışa pompalama sistemlerinin de ön plana çıktığı söylenebilir.

Bu güne kadar moleküler çalışmalarla 11 adet MBL direnç geninin saptandığı bildirilmiştir. Ancak en yaygın 6 farklı MBL direnç genini ortaya çıkarmak için moleküler yöntemlerle yapılan doğrulama deneyinde MBL pozitifliği saptanmadığından EDTA kullanılarak yapılan fenotipik test sonuçları ile moleküler test sonuçlarının uyumsuz olduğu görülmüştür. Bu durumda fenotipik test sonuçlarının kendi aralarında değerlendirmesi yapılırken en fazla özgüllük ve duyarlılık gösterdiği bildirilen MBL E-teste göre karşılaştırılma yapılmasının uygun olmayacağı sonuçlarımıza göre ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak, tüm dünyada MBL enzimlerinin yaygın olarak bulunması, komşu Balkan ülkelerinde (Bosna Hersek, Sırbistan, Kosova ve Karadağ) NDM-1'in, Yunanistan ve Bulgaristan'da da VIM tipi MBL enzimlerinin ve bazı illerimizde VIM ve IMP tipi MBL enzimlerinin bildirilmesine rağmen araştırdığımız IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1, NDM-1 tipi MBL enzimleri Edirne'de saptanmamıştır. Ancak, *P. aeruginosa* kökenlerinde ülke genelinde ve tüm dünyada olduğu gibi karbapenem direncinde artış görülmektedir. Bu nedenle bundan sonraki hedef karbapenem direncine neden olan diğer karbapenemaz enzimlerinin, dış membran porin defektinin veya aktif dışa pompalama sistemlerindeki etkili genlerin moleküler yöntemlerle araştırılmasını içeren çalışmaların devam etmesi olmalıdır. Direnç mekanizmalarının bilinmesi, karbapenem direncinin yayılımının önlenmesi açısından önemlidir.

SONUÇLAR

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (Hastanesi) Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'ne Haziran 2011- Haziran 2012 tarihleri arasında gönderilen materyallerden izole edilen ve karbapenem grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı / dirençli olduğu kabul edilen 35 *P. aeruginosa* kökeni fenotipik ve genotipik yöntemlerle MBL enzimleri açısından incelendi. Yapılan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. Çalışmamızda incelenen *P. aeruginosa* 'lar en sık YBÜ (%48.5) olmak üzere, %31.4'ü cerrahi kliniklerden, %20'si dahili kliniklerden gelen kökenler idi. YBÜ, hastanenin diğer servislerine göre *P. aeruginosa* enfeksiyonları açısından daha riskli durumdadır.
2. Çalışma süresince gelen materyallerden en çok solunum örneklerinde (%37), idrarda (%20) ve dokuda (%20) *P. aeruginosa* kökenleri saptandı.
3. Çalışmada karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde, MBL enzimlerinin varlığını göstermek amacı ile fenotipik testlerden MBL E-test, 0.5 M EDTA'lı KDDT, 0.1 M EDTA'lı KDDT, ÇDST yapıldı. Bu testler ile MBL pozitifliği sırasıyla %54.2, %94.2, %37.1, %42.8 oranında saptandı. MBL E-test ile karşılaştırılan fenotipik testlerden, ÇDST (%80) ve 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT'nin (%76) duyarlılık oranları yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.03$).
4. Genel karbapenemaz direncini gösteren bir fenotipik test olan MHT ile kökenlerin hiçbirinde MBL pozitifliği saptanmadı.
5. Çalışmada *Pseudomonas* kökenlerinde moleküler yöntemlerle MBL enzimlerin varlığı araştırıldı. IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1 tipi MBL enzimleri birbirlerine yakın primerler kullanılarak multipleks PZR ile araştırıldı. İlaveten, NDM-1 direnç genini

aramaya yönelik PZR yöntemi çalışıldı. İncelenen kökenlerde MBL direnç genlerine rastlanılmadı.

6. *Pseudomonas*'larda karbapenemaz direncinden sorumlu en yaygın MBL enzimlerine Edirne ilinde rastlanılmadı. Hastanemizden izole edilen kökenlerde değişen oranlarda MBL pozitifliği saptayan fenotipik testlerin yalancı pozitiflik gösterdiği düşünüldü. Fenotipik test sonuçlarının kendi aralarında değerlendirmesi yapılırken en fazla özgüllük ve duyarlılık gösterdiği bildirilen MBL E-testte göre karşılaştırılma yapılmasının uygun olmadığı görüldü. Fenotipik test sonuçlarını yorumlarken bölgede en yaygın bulunan direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması da gerekir.
7. Kökenlerimizde mevcut karbapenem direncinden farklı direnç mekanizmaları sorumlu olabilir.

ÖZET

Karbapenemlere dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri, tedavide ciddi sorunlara neden olmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde karbapenem grubu antibiyotiklere dirençte rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri metallo beta laktamaz enzimlerinin bulunmasıdır ve çok sayıda enzim tanımlanmıştır. Metallo beta laktamaz genleri kromozom ya da plazmid üzerinde bulunur ve farklı bakteri kökenleri arasında kolayca yayılabilmektedir. Bu enzimlerin aktivitesi çinko bağımlıdır ve etilendiaminotetraasetik asit ile inhibe olmaktadır. Bu yüzden metallo beta laktamaz tanımlama testlerinde bu özellikten yararlanılmaktadır. Bu çalışmada Edirne’de metallo beta laktamaz enzimlerinin araştırılması amaçlandı.

Karbapenemlere orta duyarlı/dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde metallo beta laktamaz varlığı, fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırıldı. Beş fenotipik test uygulandı. Ardından blaIMP, blaVIM, blaGIM, blaSIM, blaSPM genleri multipleks, blaNDM geni ise polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı.

Pseudomonas aeruginosa kökenlerinde, E-test ile %54.2, 0.5 M ve 0.1 M etilendiaminotetraasetik asit ile yapılan kombine disk difüzyon testiyle sırasıyla %94.2 ve %37.1, çift disk sinerji testiyle %42.8 oranında pozitiflik saptandı. Modifiye Hodge testiyle metallo beta laktamaz pozitifliği saptanmadı. E teste göre Çift disk sinerji testi (%80) ve 0.1 M etilendiaminotetraasetik asit ile yapılan kombine disk difüzyon testi (%76) duyarlılık oranları yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,03$). Genotipik yöntemlerle kökenlerde aranılan metallo beta laktamaz genleri saptanmadı.

Pseudomonas’larda karbapenem direncinden sorumlu olan en yaygın metallo beta laktamazlara Edirne’de rastlanılmadı. Fenotipik test sonuçlarının kendi aralarında

değerlendirmesi yapılırken yüksek özgüllük ve duyarlılık gösterdiği bildirilen E-teste göre karşılaştırılmasının her zaman uygun olmadığı fark edildi. Fenotipik test sonuçlarının doğru değerlendirilmesi için bölgede yaygın bulunan direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması gerekmektedir. Hastanemizden izole edilen kökenlerde karbapenem direncinden farklı mekanizmaların sorumlu olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo beta laktamaz, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu

IDENTIFICATION OF METALLO BETA LACTAMASES IN CARBAPENEM RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

SUMMARY

Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains causes serious problems in treatment. A large number of identified metallo beta lactamase enzymes produce by *Pseudomonas aeruginosa* are the one of the most important mechanism in the resistance to carbapenems. Metallo beta lactamase genes are located on chromosome or plasmid and they can easily spread between the different bacterial strains. The activities of these enzymes are zinc-dependent and they are inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid. Therefore, this advantage is used in metallo beta lactamase identification tests. In this study, it was aimed to determine the metallo beta lactamase among *P. aeruginosa* strains isolated in Edirne.

The existence of metallo beta lactamase enzymes in carbapenems moderately resistant/susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains were investigated by phenotypic and genotypic tests. Five phenotypic tests were used. And then, blaIMP, blaVIM, blaGIM, blaSIM, blaSPM genes and blaNDM gene were investigated by multiplex and polimerase chain reaction, respectively.

Among the carbapenems resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates, positivity of metallo beta lactamase was found as 54,2% by E-test, 42.8% by double disk synergy test, 94.2% and 37.1% by combined disk diffusion method by using 0.5 M and 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid, respectively. The metallo beta lactamases in all these strains were detected as negative by modified Hodge test. The susceptibility rates were higher in

double disk synergy test (80%) and combined disk diffusion test by using 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (76%) according to E-test ($p= 0.008$ and $p= 0.03$, respectively). In *Pseudomonas aeruginosa* strains, metallo beta laktamase genes were not detected by applied genotypic methods.

The most common metallo beta laktamase enzymes responsible for resistance to carbapenem in *Pseudomonas* were not observed in Edirne. It was realized that to compare the phenotypic test results according to metallo beta laktamase E-test, which was reported with a high sensitivity and specificity, was not appropriate always during the interpretation of the phenotypic test results between each other. In order to evaluation correctly of the phenotypic test results is also required to investigation of resistance genes is most common in the region, by molecular methods. It was thought that the different mechanisms might be responsible for the identified carbapenem resistance at strains isolated in our hospital.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo beta laktamase, multiplex polymerase chain reaction

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas* ve İlişkili Bakteriler (Çeviri: P. Çıragil) Başustaoğlu AC, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Yapar M (Editörler) Tıbbi Mikrobiyoloji'de. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti; 2010.s.333-41.
2. Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zorawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46:137-42.
3. Bahar G, Mazzariol R, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:282-3.
4. Çakar A. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005.
5. Özgümüş OB, Ceylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydın K, Köksal I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* 2007;13:191-8.
6. Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:221-2.
7. Saraç G. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Karbapenem Direnci Ve Direncin Moleküler Olarak Saptanması (tez). Mersin: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.
8. Blondel EH, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington: ASM press; 2007.p.734-48.
9. Erdem B. *Pseudomonaslar*. Ustaçelebi Ş (editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. s.551-8.

10. Wenstern RA, Heiden MK. Multiple drug resistant pathogenes: Epidemiology and control. In: Jarvis WR (Eds.). Bennett & Brachman's Hospital Infections. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007.p.215-36.
11. Brooks GF, Carroll KC. Pseudomonas'lar, Acinetobacter'ler ve Ender Gram Negatif Bakteriler (Çeviri: D. Gür). Yenen OŞ. (Editör) Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2010.s.263-9.
12. Çetinkaya YŞ. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.s.545-57.
13. Öncül O. Hastane Kaynaklı Bakteriyel Enfeksiyonlar. Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.s.575-604.
14. Johansen TE, Cek M, Naber KG, Stratchounski L, Svendsen MV, Tekne P. Hospital acquired urinary tract infections in urology departments: pathogens, susceptibility and use of antibiotics. Data from the PEP and PEAP-studies. Int J Antimicrob Agents 2006;28:91-107.
15. Ak Ö, Bombacı E, Özer S, Çolakoğlu S. Yoğun Bakım Ünitimizde Gelişen Nozokomiyal İnfeksiyonlar. Yoğun Bakım Derg 2006;6:222-6.
16. Çelik İ, İnci N, Denk A, Sevim E, Yaşar D, Yaşar MA. Prevalence of Hospital Acquired Infections in Anesthesiology Intensive Care Unit. Fırat Tıp Derg 2005;10:132-5.
17. Rocha LA, Vilela CA, Cezario RC, Almeida AB, Gontijo Filho P. Ventilator associated pneumonia in an adult clinical surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. Braz J Infect Dis 2008;12:80-5.
18. Yurtsever SG, Kurultay N, Çeken N, Yurtsever Ş, Afşar İ, Şener G ve ark. Yara Yeri Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar Ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2009;23:34-8.
19. Sümer Z, Bakıcı Z, Türkay C, Gökçe G, Gökğöz Ş. Yatırılarak izlenen hastaların yara yeri ve idrar örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001;31:14-8.
20. Kang C, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh M et al. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome. Clinical Infectious Diseases 2003;37:745-51.
21. Horino T, Chiba A, Kawano S, Kato T, Sato F, Maruyama Y. Clinical Characteristics and Risk Factors for Mortality in Patients with Bacteremia Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Intern Med 2012;51:59-64.
22. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:7072-7.

23. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyaller. *Ankem Derg* 2003;17:192-204.
24. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012;27:128-42.
25. Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis* 2011;53:177-84.
26. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2011. <http://www.ecdc.europa.eu> (01.01.2013)
27. Korten V, Söyletir G, Yalçın AN, Ögünç D, Dokuzoğuz B, Esener H ve ark. Karbapenemlerin Gram-Negatif Patojenlere Karşı İn Vitro Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Değerlendirmesi: COMPACT Çalışması Türkiye Verisi. *Mikrobiyol Bul* 2011;45:197-209.
28. Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (Uhesa) Raporu Özet Veri. 2010. http://www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/analiz_2010.pdf (02.01.2013)
29. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-40.
30. Nikaido H. Antibiotik resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998;27:32-41.
31. Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between MexAB OprM efflux pump and β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;5:1301-3.
32. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009;58:1133-48.
33. Maniati M, Ikonomidis A, Mantzana P, Daponte A, Maniatis AN, Pournaras S. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/ blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:132-5.
34. Lister PD, Wolter DJ, Wickman PA, Reisbig MD. Levofloxacin/imipenem prevents the emergence of high-level resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains already lacking susceptibility to one or both drugs. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:999-1003.
35. El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijser B, Kronvall G, Wretling B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 2005;113:187-96.
36. Akkurt L, Havuz G S, Uyar Y, Karadağ A, Esen Ş. 1999-2000 yıllarında yoğun bakım ünitelerinden izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2002;16:14-7.
37. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.

38. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:223-32.
39. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
40. Chanowong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended spectrum β lactamases in gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:839- 52.
41. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:128-31.
42. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impacts. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2385-92.
43. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:104-14.
44. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR - restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:11-8.
45. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2598-603.
46. Philippon LN, Naas A, Bouthors T, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2188-95.
47. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2043-8.
48. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4828-33.
49. Aktaş Z, Satana D, Kayacan Ç, Can B, Gönüllü N, Küçükbaşmacı Ö. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Oranları ve Beta-Laktam Direnç Mekanizmalarının Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2012;46:386-97.
50. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1637-44.

51. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1881-4.
52. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:3117-22.
53. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1362-6.
54. Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. Pathol Biol 2009;57:493-5.
55. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended spectrum class 2d' β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2859-63.
56. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4654-61.
57. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
58. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? Lancet Infect Dis 2011;11:381-93.
59. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galenli M, Amicosante G, Frere JM, Bush K et al. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2003;51:257-66.
60. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:349-53.
61. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankum R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:824-9.
62. Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall LMC, Livermore DM. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. Lancet 1999;353:2162.
63. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol 2001;39:4433-9.

64. Koh TH, Khoo CT, Tan TT, Arshad M, Ang LP, Lau LJ et al. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo- β -lactamase genes, including the novel blaIMP-26 gene. J Clin Microbiol 2010;48:2563-4.
65. Jeannot K, Poirel L, Nicoud MR, Cholley P, Nordmann P, Plésiat P. IMP-29, a Novel IMP-Type Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:2187-90.
66. Pournaras S, Köck R, Mossialos D, Mellmann A, Sakellaris V, Stathopoulos C et al. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo- β -lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). J Antimicrob Chemother 2013;22:1-6.
67. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect 2004;10:272-88.
68. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. Clin Infect Dis 2005;41:1549-56.
69. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1584-90.
70. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleakis LS, Maniatis AN. Novel variant bla(VIM-4) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:4026-8.
71. Giske CG, Rylander M, Kronvall G. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3034-5.
72. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:648-50.
73. Samuelsen Q, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. Clin Microbiol Infect 2011;17:1811-6.
74. Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Petinaki E, Vatopoulos AC, Tzelepi E, Miriagou V et al. Characterization of metallo-beta-lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae* ST147. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:3570-2.
75. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:5046-54.

76. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 2011;66:689-92.
77. Hsueh PR. New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among *Enterobacteriaceae*. *J Formos Med Assoc* 2010;109:685-7.
78. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:8-14.
79. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* 2011;11:164.
80. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L. Emergence of NDM-1 Metallo-beta-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3929-31.
81. El-Herte RI, Kanj SS, Matar GM, Araj GF. The threat of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Lebanon: an update on the regional and local epidemiology. *J Infect Public Health* 2012;5:233-43.
82. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoğlu S, Özer UG, Nordmann P. NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2784-5.
83. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1260-2.
84. Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5396-8.
85. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2184-6.
86. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5952-4.
87. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:529-33.
88. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:699-702.

89. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AS. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. Clin Microbiol Infect 2005;11:73-6.
90. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002;50:673-9.
91. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;18:306-25.
92. Lee K, Yum KH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91.
93. Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo-beta-Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:2420-4.
94. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T et al. KHM-1, a novel plasmid mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:4194-7.
95. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD et al. FIM-1, a new acquired metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:410-6.
96. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase- producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect Dis 2001;7:88-102.
97. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. Clin Microbiol Newsletter 2009;31:55-62.
98. Aktaş Z, Kayacan CB. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. Scand J Infect Dis 2008;40:320-5.
99. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE et al. Metallo-β-Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates. J Clin Microbiol 2008;46:2028-37.
100. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. Clinics 2010;65:825-9.
101. Woodford N. Rapid Characterization of β lactamases by Multiplex PCR. In: Gillespie SH. and McHugh TD (Eds.). Antibiotic Resistance Protocols. 2th ed. London: Humana Press; 2010. p.181-92.

102. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21. Wayne, Pennsylvania, USA, 2011.
103. Sapino B, Mazzuccato S, Solinas M, Gion M, Grandesso S. Comparison of different methods for determining beta-lactam susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. New Microbiol 2012;35:491-4.
104. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006;44:3139-44.
105. Zarfel G, Hoenigl M, Leitner E, Salzer HJ, Feierl G, Masoud L et al. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase, Austria. Emerg Infect Dis 2011;17:129-30.
106. Dündar D, Tamer GS. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. ANKEM Derg 2009;23:17-21.
107. Kalem F, Gündem NS, Feyzioğlu B, Arslan U, Turncer İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2008;22:123-6.
108. Gültekin B, Eyigör M, Aydın N. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2004;18:1-4.
109. Kim BM, Jeon EJ, Jang JY, Chung JW, Park J, Choi JC et al. Four Year Trend of Carbapenem-Resistance in Newly Opened ICUs of a University-Affiliated Hospital of South Korea. Tuberc Respir Dis 2012;72:360-6.
110. Öztürk EC, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci Ve Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığı. ANKEM Derg 2011;25:42-7.
111. Üstün C. Hastane Kökenli Karbapenem Dirençli Ve Duyarlı *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları. ANKEM Derg 2010;24:1-6.
112. Mansur A. Turgut Özal Tıp Merkezinde 2009 Yılında Nozokomiyal *Pseudomonas Aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Direnç, İndüklenebilir Beta Laktamaz Ve Metallo Beta-Laktamaz Oranlarının Belirlenmesi (tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2010.
113. Oh EJ, Lee S, Park, YJ, Park JJ, Park K, Kim SI et al. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. J Microbiol Methods 2003;54:411-8.
114. Lee K, Lee WG, UH Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp in Korean hospitals. Emerg Infect Dis 2003;9:868-71.
115. Walsh T, Bolmström A, Qvarnström A, Gales A. Evaluation of a new E test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002;40:2755-9.

116. Van der Bij AK, Mol M, van Westreenen M, Goessens WH, Pitout JD. The laboratory diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* that produce metallo- β -lactamases in a Dutch tertiary care centre. Scand J Infect Dis 2011;43:596-602.
117. Qu TT, Zhang JL, Wang J, Tao J, Yu YS, Chen YG et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. J Clin Microbiol 2009;47:1136-42.
118. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J. Phenotypic detection of metallo- β -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. ScientificWorldJournal 2012;2012:1-7.
119. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005;43:3129-35.
120. Öztürk E, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında Antibiyotik Direnci Ve Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığı. ANKEM Derg 2011;25:42-7.
121. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ, Karahan ZC, Baran I ve ark. İmipenem dirençli *Acinetobacter* İzolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2011;41:29-36.
122. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:248-52.
123. Toraman ZA, Yakupogullari Y, Kizirgil A. Detection of metallo β -lactamase production and antibiotic resistance with E-test method in *pseudomonas*, *acinetobacter* and *klebsiella* strains, in Turkey. J Infect Chemother 2004;10:257-61.
124. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49:5-11.
125. Cesur S, Yildiz E, Irmak H, Gülay Z, Arslan U, Nevgun SO. Metallobeta-Lactamase Enzymes and Antibiotic Susceptibilities in Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Intensive Care Units in Turkey. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32:687-93.
126. Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun Bakımda İzole Edilen *Pseudomonas* Spp. Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığının Araştırılması. ANKEM Derg 2011;25:150-6.
127. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 2005;31:707-10.
128. Limoncu MH, Ermertcan Ş, Çavuşoğlu C, Eraç B. The investigation of metallo-beta-lactamase enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species isolated from nosocomial infections]. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006;36:79-82.

- 129.Lee K, Lim Y S, Yong D, Yum J H, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk-synergy test for differentiating metallo-betalactamaseproducing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol 2003;41:4623-9.
- 130.Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S. bla(IMP) and bla(VIM) mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. J Infect Dev Ctries 2012;6:757-62.
- 131.Alışkan HE, olakoęlu ř, Bostanoęlu E, Turun T, Gmen JS. İki Yıllık Srete Yapılan Modifiye Hodge Testi Sonularının İrdelenmesi. ANKEM Derg 2011;25:169-172.
- 132.Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. J Clin Microbiol 2011;49:718-21.
- 133.Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill 2008;20:13.
- 134.Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2977-9.
- 135.Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60:125-8.
- 136.Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-beta-lactamase gene bla(VIM) in a level I Iranian burn hospital. Burns 2010;36:826-30.
- 137.Kkbasmacı , Midilli K, Issa G, Güven , Gönüllü N. VIM ve IMP Tipi Metallo Beta Laktamaz Genlerinin Hızlı Saptanması İçin Yeni Bir Multipleks PZR Metodu. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30:1312-6.
- 138.Eser K, Ergin A, Hařelik G. Eriřkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. Mikrobiyol Bul 2009;43:383-90.
- 139.Türk Dağı H, Kuř H, Keyik ř, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D. Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. ANKEM Derg 2012;26:187-92.
- 140.Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, Monteiro N, Nagy E, Peixe L. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2009;64:657-8.
- 141.Segal H, Elisha BG. Use of E test MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2005;56:598.

142. Wang J, Zhou JY, Qu TT, Shen P, Wei ZQ, Yu YS et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. Int J Antimicrob Agents 2010;35:486-91.
143. Mac Aogain M, Kulah C, Rijnsburger M, Celebi G, Savelkoul PH, O'Gara F et al. Characterization of imipenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey. Clin Microbiol Infect 2012;18:262-5.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/90				
	PROTOKOL ADI	Karbapenemlere Dirençli Pseudomonas Aeruginosa Kökenlerinde Metallobeta Laktamaz Enzimlerinin Fenotipik Yöntemlerle ve Moleküler Yöntemle Araştırılması				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. Murat TUĞRUL				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Ulusal	☐ Çok Merkez ☐ Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 08/ 09		Tarih: 06.04.2011			
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Görevli Prof. Dr. Murat TUĞRUL'un sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Mükerrrem Duygu AKSOY'un tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Araştırma Projeleri (TUBAP) tarafından karşılanması koşuluyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI		Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUBADK Yönergesi				
ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Fiğen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	İzinli
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL
Dekan