

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

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
PSEUDOMONAS AERUGİNOSA SUŞLARINDA PER-1, OXA-10 VE  
VEB-1 TİP GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ  
ENZİMLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. OSMAN ACAR**

**DANIŞMAN  
DOÇ.DR. MELEK DEMİR**

**DENİZLİ-2013**

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

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
PSEUDOMONAS AERUGİNOSA SUŞLARINDA PER-1, OXA-10 VE  
VEB-1 TİP GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ  
ENZİMLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. OSMAN ACAR**

**DANIŞMAN  
DOÇ.DR. MELEK DEMİR**

**Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 19.07.2011 tarih ve  
2011TPF028 nolu kararı ile desteklenmiştir.**

**DENİZLİ-2013**

Doç. Dr. MELEK DEMİR danışmanlığında Dr. OSMAN ACAR tarafından yapılan “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında PER-1, OXA-10 ve VEB-1 tip genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerinin varlığının araştırılması” başlıklı tez çalışması 11/12/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof.Dr. İlknur KALELİ

ÜYE: Doç.Dr. Melek DEMİR

ÜYE: Doç.Dr. Nural CEVAHİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 27/ 02/2014

Prof. Dr. Hasan HERKEN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren, tez çalışmamın başından sonuna kadar her türlü desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Melek DEMİR'e; sevgi, saygı ve hoşgörünün ön planda olduğu bir akademik ortam sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile bizlerin eğitiminde büyük emeği olan değerli hocalarım, başta ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. İlknur Kaleli olmak üzere Prof. Dr. Çağrı Ergin, Doç. Dr. Nural Cevahir, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Şengül, Yrd. Doç. Dr. Ergun Mete'ye; beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma; Tıbbi Mikrobiyoloji AD.'nın tüm personeline; beni bugünlere getiren sevgili anneme ve babama; sevgisi, şefkati ve sabrıyla her daim yanımda olan eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XI
TABLolar DİZİNİ .....	XII
ÖZET .....	XIII
İNGİLİZCE ÖZET .....	XIV
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
<i>PSEUDOMONAS</i> .....	3
<i>P. AERUGINOSA</i> .....	4
Morfoloji ve Boyanma Özellikleri .....	4
Kültür ve Üreme Özellikleri .....	4
Biyokimyasal Özellikleri .....	4
Virulans Faktörleri .....	5
<i>Kirpik (Flagella)</i> .....	5
<i>Pilus (Fimbriae)</i> .....	5
<i>Lipopolisakkarit (LPS)</i> .....	5
<i>Aljinat</i> .....	5

<i>Elastaz</i> .....	6
<i>Proteaz IV</i> .....	6
<i>Pigmentleri</i> .....	6
<i>Fosfolipaz C</i> .....	6
<i>Ramnolipid</i> .....	7
<i>Ekzotoksin A (Ekzo A)</i> .....	7
<i>Tip-3 Sekresyon Sistemi</i> .....	7
<i>Biyofilm</i> .....	8
<i>Quorum Sensing (QS)</i> .....	8
<b>Patogenez</b> .....	8
<b>Epidemiyoloji</b> .....	9
<b><i>P. AERUGINOSA ENFEKSİYONLARI</i></b> .....	9
<b>Solunum Sistemi Enfeksiyonları</b> .....	10
<b>Bakteriyemi</b> .....	10
<b>Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları</b> .....	10
<b>Üriner Sistem Enfeksiyonları</b> .....	11
<b>Göz Enfeksiyonları</b> .....	11
<b>Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları</b> .....	11
<b>Kulak Enfeksiyonları</b> .....	12
<b>Kemik ve Eklem Enfeksiyonları</b> .....	12
<b>Gastrointestinal Enfeksiyonlar</b> .....	12

<b>ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK .....</b>	<b>12</b>
<b>ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI .....</b>	<b>14</b>
<b>Aktif Pompa Sistemlerinin Uyarılması .....</b>	<b>14</b>
<b>Dış Membran Geçirgenliğinin Azalması .....</b>	<b>15</b>
<b>Hedef Yapısında Değişiklik .....</b>	<b>15</b>
<b>İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi .....</b>	<b>16</b>
<b>BETA LAKTAMAZLAR .....</b>	<b>16</b>
<b>İndüklenebilir Beta Laktamazlar .....</b>	<b>18</b>
<b>Karbapenemazlar.....</b>	<b>19</b>
<b>Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar .....</b>	<b>20</b>
<b><i>TEM ve SHV Türevi GSBL'ler</i> .....</b>	<b>21</b>
<b><i>CTX-M</i> .....</b>	<b>21</b>
<b><i>PER-1</i> .....</b>	<b>21</b>
<b><i>OXA Türevi GSBL'ler</i> .....</b>	<b>22</b>
<b><i>VEB-1</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>GSBL TANI YÖNTEMLERİ .....</b>	<b>24</b>
<b>GSBL Tarama Testleri .....</b>	<b>24</b>
<b>GSBL Doğrulama Testleri .....</b>	<b>24</b>
<b><i>Çift Disk Sinerji Testi</i> .....</b>	<b>24</b>
<b><i>Kombine Disk Testi</i> .....</b>	<b>24</b>
<b><i>E-Test Yöntemi</i>.....</b>	<b>25</b>

<i>Üç Boyutlu Test</i> .....	25
<i>Mikrodilüsyon Yöntemi</i> .....	25
<i>Moleküler Yöntemler</i> .....	25
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	27
<b>SUŞLARIN İZOLASYONU VE SAKLANMASI</b> .....	27
<b>ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN SAPTANMASI</b> .....	27
<b>GSBL VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI</b> .....	28
<b>Çift Disk Sinerji Testi</b> .....	28
<b>E-Test Yöntemi</b> .....	28
<b>PER-1, OXA-10 BENZERİ ve VEB-1 tip BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI</b> .....	29
<b>DNA Ekstraksiyonu</b> .....	29
<b>PER-1 Geninin Varlığının Araştırılması</b> .....	29
<b>OXA-10 Benzeri Gen Varlığının Araştırılması</b> .....	30
<b>VEB-1 Geninin Varlığının Araştırılması</b> .....	32
<b>RAPD ANALİZİ</b> .....	33
<b>BULGULAR</b> .....	35
<b>TARTIŞMA</b> .....	44
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	59
<b>KAYNAKLAR</b> .....	61



## SİMGELER VE KISALTMALAR

- ABC** : ATP binding cassette  
**ADPRT** : ADP riboziltransferaz  
**AMC** : Amoksisilin-klavulanik asit  
**AME** : Aminoglikozid modifiye edici  
**Bç** : Baz çifti  
**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth  
**CA** : Klavulanik asit  
**cAMP** : Siklik Adenozin Monofosfat  
**CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
**CFU** : Colony forming unit  
**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute  
**EDTA** : Etilendiamintetraasetik asit  
**EkzoA** : Ekzotoksin A  
**EkzoS** : Ekzotoksin S  
**EkzoT** : Ekzotoksin T  
**EkzoU** : Ekzotoksin U  
**EkzoY** : Ekzotoksin Y  
***E.coli*** : *Escherichia coli*  
**GAP** : GTPaz aktive eden protein  
**GSBL** : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz  
**İBL** : İndüklenebilir beta-laktamaz  
**IFN-gama** : İnterferon-gama  
**IL-8** : İnterlökin-8  
**LCR** : Ligase chain reaction  
**LasA** : Elastaz A  
**LasB** : Elastaz B  
**LPS** : Lipopolisakkarit  
**MBL** : Metallo-beta-laktamazlar  
**MFP** : Membran füzyon proteini  
**MHT** : Modifiye Hodge Testi

**MİK** : Minimum inhibitör konsantrasyon

**OMF** : Dış membran faktörü

**OR** : Odds ratio

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**PBP** : Penisilin bağlayan protein

**PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**PCR-RFLP** : PCR-restriction fragment length polymorphis

**PCR-SSCP** : PCR-single strand conformation polymorphism

**QS** : Quorum Sensing

**RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA

**RND** : Resistance-nodulation-division

**SP-A** : Surfaktan protein-A

**SP-D** : Surfaktan protein-D

**TLR-2** : Toll benzeri reseptör-2

**TLR-4** : Toll benzeri reseptör-4

**TLR-5** : Toll benzeri reseptör-5

**TNF-alfa** : Tümör nekroz faktör-alfa

**TZB** : Tazobaktam

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1</b> <i>P. aeruginosa</i> suşlarında, PERA ve PERD primerleri ile saptanan <i>PER-1</i> (926 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri	37
<b>Şekil 2</b> <i>P. aeruginosa</i> suşlarında, OPR1 ve OPR2 primerleri ile saptanan <i>OXA-10</i> (720 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri	38
<b>Şekil 3</b> <i>PER-1</i> (926 bç) ve <i>OXA-10</i> (720 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri	38
<b>Şekil 4</b> İzole edilen tüm suşlar arasındaki RAPD analizine ait dendogram	42
<b>Şekil 5</b> <i>PER-1</i> ve/veya <i>OXA-10</i> benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 izolatın RAPD analizine ait dendogramı	43
<b>Şekil 6</b> <i>PER-1</i> ve/veya <i>OXA-10</i> benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 izolatın RAPD analizinin PCR görüntüsü	43

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> Beta-laktamazlar için sınıflandırma şeması	17
<b>Tablo 2</b> Plazmid aracılı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar	20
<b>Tablo 3</b> <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı	35
<b>Tablo 4</b> <i>P. aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	36
<b>Tablo 5</b> PER-1 pozitifliği saptanan 6 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları	39
<b>Tablo 6</b> OXA-10 pozitifliği saptanan 9 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları	40
<b>Tablo 7</b> PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda saptanmış olan 2 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servisler	40
<b>Tablo 8</b> Seftazidime dirençli ve duyarlı olan suşlarda PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz görülme oranı	40

## ÖZET

### **Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında PER-1, OXA-10 ve VEB-1 tip genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerinin varlığının araştırılması**

Dr. Osman ACAR

*P. aeruginosa*, antimikrobiyal ajanlara hızla direnç geliştirebilen önemli bir hastane enfeksiyonu etkenidir. Özellikle PER-1, OXA-10, ve VEB-1 gibi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), antibiyotik direncinde önemli rol oynayan enzimlerdir.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında PER-1, OXA-10, ve VEB-1 tip genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin varlığının fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Ocak 2011–Şubat 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 160 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edildi. Suşların antibiyotik duyarlılıkları, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Çift disk sinerji testi, E-Test ve PCR yöntemi kullanılarak GSBL varlığı araştırıldı. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla RAPD-PCR analizi yapıldı.

Sonuç olarak çalışmaya alınan 160 *P. aeruginosa* suşunun hiçbirinde çift disk sinerji testi ve E-Test yöntemiyle GSBL varlığı saptanmadı. PCR yöntemiyle % 3.75 oranında PER-1, % 5.6 oranında OXA-10 tip GSBL varlığı saptandı. Toplam 2 suşta (% 1.2) ise PER-1 ve OXA-10 beta laktamaz varlığı aynı anda izlendi. Seftazidim dirençli suşlar arasında PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği %22.5 olarak bulundu. Suşların hiçbirinde VEB-1 geni saptanmadı. Yapılan RAPD analizine göre GSBL pozitif saptanan suşlar arasında herhangi bir klonal baskınlık izlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** *P. aeruginosa*, Antibiyotik Direnci, GSBL, RAPD-PCR

## SUMMARY

### **Investigation of the presence of PER-1, OXA-10 and VEB-1 type extended spectrum beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens**

Dr. Osman ACAR

*P. aeruginosa* is an important cause of nosocomial infections and its ability to rapidly develop resistance to antimicrobial agents. Especially extended spectrum beta lactamases (ESBL) such as PER-1, OXA-10 and VEB-1 enzymes which play an important role in antibiotic resistance.

The aim of this study was to investigate presence of PER-1, OXA-10 and VEB-1 type extended spectrum beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens by phenotypic and genotypic assays.

Between January 2011 and February 2012, in Pamukkale University Health Research and Practice Center, Laboratory of Medical Microbiology, 160 *P. aeruginosa* strains isolated from clinical specimens were included in the study. Antibiotic susceptibility was determined by Kirby-Bauer disk diffusion method. Investigated to the presence of ESBL by double disk synergy test, E-Test and PCR method. RAPD-PCR analysis was performed to determine the clonal relationships between the strains.

As a result, presence of ESBL was not detected by double disk synergy test and E-Test method in 160 *P. aeruginosa* strains in the study. PER-1 and OXA-10 type ESBL were detected in 3.75 % and 5.6 % of *P. aeruginosa* strains, respectively by PCR method. Co-presence of PER-1 and OXA-10 beta lactamase were shown in two isolates. PER-1 and/or OXA-10 like beta lactamase were detected in 22.5 % of cefazidime resistance *P. aeruginosa* strains. VEB-1 gene was found in any of the strains. Based on the RAPD-PCR analysis, there was not clonal dominance between ESBL positive isolates.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, Antibiotic Resistance, ESBL, RAPD-PCR

## GİRİŞ

Hastane enfeksiyonlarının, yol açtığı morbidite ve mortalite nedeniyle hasta, toplum ve sağlık ekonomisi açısından önemli bir sorun olduğu bilinmektedir (1). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) enfeksiyonları, hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenlerinden birisidir (2).

*P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar arasında ventilatörle ilişkili, nötropenik ve kistik fibrozisli hastalarda pnömoni, yanık sonrası gelişen yara yeri enfeksiyonları, follikülit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, nötropenik hastalarda bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları, özellikle yüzücülerde, diyabetik hastalarda ve yaşlılarda kulak enfeksiyonları, intravenöz ilaç kullananlarda endokardit, kontakt lens kullanımı ve korneanın bütünlüğünün bozulduğu durumlarda meydana gelen göz enfeksiyonları yer almaktadır (3, 4).

*Pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara direncin çabuk gelişmesi ve yüksek direnç oranları önemli bir sorundur. Çoklu ilaç direnci gösteren izolatların sayısı uygun olmayan antibakteriyel ajanların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan enfeksiyonların tedavisi ciddi problemler oluşturmaktadır (2, 5).

Bakteriler, antibiyotiklere çeşitli mekanizmalarla direnç kazanabilirler. Bu mekanizmalardan biri de beta-laktamaz üretimidir (6). 1980'lerden itibaren birçok yeni beta-laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile eş zamanlı olarak beta-laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir. OXA, PER-1 ve VEB-1 grubu enzimler, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleridir. Özellikle *P. aeruginosa* tarafından üretilmekte ve antibiyotik direncinde önemli rol oynamaktadırlar (7-9).

OXA grubu enzimler, Ambler sınıf D'de yer alan ve daha çok *P. aeruginosa*'da bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleridir (7). Son yıllarda 125'in üzerinde OXA grubunda yer alan enzim tanımlanmıştır. Bunların çoğunluğu OXA-10 ve OXA-2 enzimlerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda türeyen enzimlerdir (10).

PER-1 enzimi Ambler sınıf A'da yer alan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimidir. İlk kez Fransa'da bir *P. aeruginosa* suşunda (11, 12) sonrasında ise

Türkiye ve İtalya'da *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde gösterilmiştir (13, 14).

VEB-1 enzimi de Ambler sınıf A'da yer alan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimidir. Fransa, Tayland, Hindistan, Çin, Bulgaristan gibi farklı ülkelerden *P. aeruginosa* suşlarında saptandığına dair yayınlar rapor edilmiştir (11).

*P. aeruginosa*, özellikle hastanede yatan ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde ciddi seyirli klinik tablolara yol açmaktadır. Hastane ortamında sık ve geniş çapta antibiyotik kullanımı dirençli suşların yayılımına ve tedavi gücüne neden olmaktadır. Antibiyotik direnç paterninin hastaneden hastaneye ve hatta aynı hastanede klinikten kliniğe değişiklikler gösterebilmesi nedeni ile ampirik antibiyotik tedavisi başlanırken, her hastanenin kendi sonuçlarını göz önüne alması gerekmektedir (15, 16).

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarında erken ve doğru antibiyotiklerle tedaviye başlanması oldukça önemlidir. Akılcı antibiyotik kullanımı ile etkin tedavinin sağlanması, antibiyotik direncinde azalma yanında mortalite ve morbiditenin azalmasına da neden olacaktır.

Bu araştırmada Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında PER-1, OXA-10 ve VEB-1 genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin varlığının araştırılması, bu enzimlerin antibiyotik dirençleriyle olan ilişkisinin saptanması ve hastanemizde kullanılacak olan ampirik tedavi seçeneklerine ve etkin tedavi yaklaşımlarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### *PSEUDOMONAS*

*Pseudomonadaceae* ailesi içerisinde yer alan *Pseudomonas* cinsi bakterileri arasında birçoğu doğada, toprak ve sulara yaygın bulunan, bir kısmı bitkiler, bir kısmı hayvanlar ve insanlar için hastalandırıcı özellik taşıyan bakteriler bulunur. İlk kez Migula tarafından 1894 yılında tanımlanan *Pseudomonas* cinsi, tür düzeyinde tanımlama metodlarındaki gelişmelere bağlı olarak pek çok kez yeniden düzenlenmiştir. Bu bakteriler beş farklı rRNA grubuna ayrılmışlardır. Ayrıca her rRNA grubu içinde de DNA uyumlarına göre alt gruplar oluşturulmuştur (3, 17).

*Pseudomonas* cinsinde bulunan bakteriler rRNA homoloji grup 1'de yer alırken, grup 2'de *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Lautropia*, *Pandoraea*, *Ralstonia* cinsinde bulunan bakteriler, grup 3'de *Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia* cinsi, grup 4'de *Brevundimonas* cinsi ve grup 5'te *Stenotrophomonas* cinsi yer almaktadır (18).

Günümüzde *Pseudomonas* cinsi içinde 160 tür olup, bunlar içinde sadece 12 tür klinik öneme sahiptir. Bunlar arasında en sık izole edilen ve en fazla klinik öneme sahip olan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) dışında *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas mosseilii*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ve *Pseudomonas luteola* yer almaktadır (3, 19).

*Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan bakterilerin tamamı non-fermantatif özellik taşımaktadırlar. Besin maddelerinden yararlanma bakımından çok geniş bir uyum göstermekte olan bu bakteriler H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'yi enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğindedirler. Ayrıca G + C'nin DNA'ya oranı % 58 – 70 mol'dur (17).

*P. aeruginosa*, ilk kez 1882'de Gessard tarafından mavi irin etkeni olarak tanımlanmıştır. *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan bakteriler arasında en sık izole edilen ve en fazla klinik öneme sahip olan türdür (17, 18).

## ***PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

### **Morfoloji ve Boyanma Özellikleri**

*P. aeruginosa*, kolay boyanan, 1.5-3.0 µm uzunluğunda ve 0.5-0.8 µm genişliğinde gram negatif basillerdir. Spor oluşturmazlar. Çoğunlukla bir uçlarında tek yada nadiren daha fazla kirpik (flagella) bulundurlar ve çok hareketlidirler. Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda, kısa veya çok uzun deforme şekilleri, haraketsiz ve pigmentsiz olanları, R tipinde üreyenleri tanımlanmıştır (17, 20).

### **Kültür ve Üreme Özellikleri**

*P. aeruginosa*, zorunlu aerob olmasına rağmen bazı durumlarda nitratın son elektron alıcısı olarak kullanılmasına bağlı olarak anaerob olarak da üreyebilirler. En iyi 37 °C'de ürerler. Ancak 42 °C'de de üreyebilmektedirler. Besin gereksinimi çok basit olduğundan, çoğu besiyerinde kolaylıkla üreyebilirler. Kolonileri genellikle düz ve yayılmış yapıda olup kenarları girintili çıkıntılıdır. Ancak bazı kökenler polisakkarit kapsül fazlalığı sonucu mukoid görünürler. Çoğu izolat kanlı agarda beta hemoliz yapar ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Bazı türler kültürlerde karakteristik görünümde, yayılabilen pigmentler üretirler. Piyoverdin (yeşil-sarı), piyosyanin (mavi), piyorubin (kırmızı), pyomelanin (kahverengi-siyah) gibi pigmentler özellikle bakterinin demir alımı için siderofor olarak da görev yaptıklarından demirin kısıtlı olduğu durumlarda ve bekleyen pasajlarda pigment üretimi artar (3, 4, 20).

### **Biyokimyasal Özellikleri**

*P. aeruginosa*'nın oksidaz, sitrat ve L-arginin dihidrolaz aktivitesi pozitifdir. Karbonhidratları fermente etmezler. Glikoz ve ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken, maltoz ve laktozu etkilemezler. L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz aktivitesi negatiftir. Nitratı gaz oluştururlar. Ancak H<sub>2</sub>S ve eskülin negatiftir. *P. aeruginosa*'nın önemli bir metaboliti olan *2-aminoacetophenone* bileşiğinin biyolojik önemi henüz bilinmese de, kültürlerde *P. aeruginosa*'ya özgü tatlı üzüm benzeri kokuya neden olmaktadır (18, 20, 21).

## **Virulans Faktörleri**

### ***Kirpik (Flagella)***

*P. aeruginosa*'nın hareketinden sorumlu olan flagella, epitel hücrelerinin membranlarında bulunan asialoGM-1 reseptörlerine tutunarak *P. aeruginosa*'nın adezyonuna yardımcı olmaktadır. TLR-5 (Toll benzeri reseptör-5) ile etkileşime girmesi ve IL-8'in salgılanmasına neden olması da diğer önemli özellikleri arasında sayılabilir (22, 23).

### ***Pilus (Fimbriae)***

*P. aeruginosa*'da bulunan tip-4 piluslar '*twitching motility*' denilen seğirme hareketinden sorumludurlar. Tıpkı kirpik gibi ökaryotik glikolipit reseptör olan asialoGM-1 ile etkileşime giren tip-4 piluslar, adezyonda ve kolonizasyonda önemli rol oynamaktadırlar. (24, 25).

### ***Lipopolisakkarit (LPS)***

*P. aeruginosa*'nın dış membranının dış yüzeyinde yer alır. Çekirdek (*core*) polisakkarit ve buna bağlı lipid-A ile O-polisakkaritten oluşur. Lipid-A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eden bakteri endotoksinidir. Ateş, şok, oligüri, lökopeni yada lökositoz, dissemine intravasküler koagülasyon ve metabolik anormalliklerle karakterize sepsis sendromuna neden olur. Ayrıca asialoGM-1'e bağlanarak adezyonda etkin bir rol oynamaktadır. Lipopolisakkaritler, TLR4-MD2 reseptörlerine bağlanarak ve CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ile etkileşime girerek virülansta önemli rol oynamaktadırlar (18, 26, 27).

### ***Aljinat***

Aljinat, mannuronik asit ve glukuronik asitin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. *P. aeruginosa*'nın adezyonunda rol oynadığı gibi aynı zamanda bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasına etkisi olsa da, biyofilm oluşumu için varlığı şart değildir. Aljinat aşırı üretimi bakteriyi antibiyotiklerden ve fagositozdan korumaktadır. Özellikle bakterinin, IFN-gama aracılı makrofajlar

tarafından öldürülmesine karşı korumakta, konağın bakteriye karşı yanıtının zayıflamasına neden olmaktadır (26, 28, 29).

### ***Elastaz***

*P. aeruginosa*'nın elastin üzerine etki eden iki proteaz enzimi bulunmaktadır. Bunlar elastaz A (LasA) ve elastaz B (LasB)'dir. LasA'nın elastinleri parçalaması dışında ayrıca stafilolitik aktivitesi de bulunmaktadır. LasB enzimi bir çinko metalloproteazdır ve EDTA gibi çeşitli şelatörler ile inhibe olmaktadır. Elastolitik etkisiyle konak dokularında ekstraselüler matriksi hasara uğratar. Böylece bakterinin, konak epitel ve endotel bariyerini aşmasına yardımcı olur. Bu enzimin diğer önemli özelliği de surfaktan protein A ve D'nin, TNF-alfa ve IFN-gama gibi sitokinlerin inaktivasyonuna neden olmasıdır (30, 31).

### ***Proteaz IV***

Özellikle kontakt lens kullananlarda görülen, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu keratitin patogenezinde önemli rol oynar. Ayrıca SP-A ve SP-D gibi surfaktan proteinlerini etkisiz hale getirerek *P. aeruginosa*'nın neden olduğu akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (32, 33).

### ***Pigmentleri***

*P. aeruginosa*'nın piyoverdin (yeşil-sarı) ve piyosiyanın (mavi) gibi pigmentleri, bakterinin demir alımı için siderofor olarak görev yaparlar. Demirin kısıtlı olduğu durumlarda pigment üretimi artar. Piyosiyanın akciğerlerde  $\alpha_1$ -proteaz inhibitörünü inaktive ederek proteaz-antiproteaz dengesini bozar. Ayrıca hücre solunumunu inhibe etmesi, epidermal hücrelerin çoğalmasını durdurması, siliyer fonksiyonunu bozması, nötrofillerde apoptozisi indüklemesi ve kalsiyum homeostasını bozması diğer virülans özellikleri arasında sayılabilir (3, 34).

### ***Fosfolipaz C***

Konak hücre membranında bulunan fosfatidilinositol ve fosfatidilkolini hidrolize eden fosfolipaz C, *P. aeruginosa*'nın dış membranından tip-2 sekresyon sistemi ile salgılanır. *P. aeruginosa*, hemolitik ve hemolitik olmayan iki çeşit

homolog fosfolipaz C üretir. Hemolitik olmayan fosfolipaz C'nin patojenik aktivitesi tam olarak gösterilememiştir. Hemolitik fosfolipaz C'nin ise fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, vasküler geçirgenliği arttırdığı, organ hasarına neden olduğu, sitokin salınımını arttırdığı ve akciğerlerde inflamasyona neden olduğu saptanmıştır (35, 36).

### ***Ramnolipid***

Glikolipid yapısında, ısıya dayanıklı ve hemolitik aktivitesi olan bir biyosurfaktandır. Konak hücreye karşı sitotoksik olması, sıvı yüzey geriliminin azaltması, bakterinin hareketine yardımcı olması ve biyofilm yapımına katkıda bulunması önemli virulans özellikleridir. Bununla birlikte sitotoksin salınımını uyararak inflamatuvar akciğer hasarına neden olur. Ayrıca siliyer fonksiyonları bozar ve iyon transportunu inhibe ederek bronşiyal epitel hücrelerini hasara uğratar (37, 38).

### ***Ekzotoksin A (EkzoA)***

Hücre dışına tip-2 sekresyon sistemi ile salgılanır. Hayvan deneyi ile yapılan çalışmalarda ekzotoksin A'dan yoksun olan mutantların 20 kat daha az virulan olduğu gösterilmiştir. Elongasyon faktör-2'yi inaktive ederek protein sentezini inhibe eder ve böylece hücre ölümüne neden olur (39, 40, 41).

### ***Tip-3 Sekresyon Sistemi***

*P. aeruginosa*'nın translokasyon aparatı denilen oluşumu ile konak hücre membranı üzerinde açtığı por sayesinde efektör proteinlerini konak hücre sitoplazmasına direkt olarak aktardığı sistemdir. Bu proteinler, ekzoenzim S (ekzoS), ekzoenzim T (ekzoT), ekzoenzim U (ekzoU) ve ekzoenzim Y (ekzoY)'dir (42).

EkzoS toksini iki önemli fonksiyona sahiptir. Bunlardan birisi GTPaz aktive eden protein (GAP) aktivitesi olması bir diğeri ise ADP riboziltransferaz (ADPRT) aktivitesi göstermesidir. Bu özellikleri sayesinde hücre iskelet yapısını bozan EkzoS'in ayrıca TLR-4 ve TLR-2'ye bağlanarak konağın inflamatuvar yanıtını düzenlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte akciğer enfeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açar ve bakterinin yayılmasında da rol oynar (26, 42).

EkzoT'nin aminoasitleri EkzoS ile %76 benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla benzer aktiviteye sahiptir. Amino ucu GAP aktivitesi gösterirken, karboksi ucu ADPRT aktivitesi göstermektedir. Ayrıca yara iyileşmesini inhibe edici özelliği vardır (26,42). EkzoU ökaryotik hücrelerde hızlı hücre ölümüne neden olan potent bir fosfolipaz aktivitesine sahiptir. Hayvan deneylerinde akciğer hasarı ve septik şoka neden olduğu gösterilmiştir (42, 43).

EkzoY, adenilat siklaz aktivitesine sahiptir. Konak hücrede intraselüler cAMP konsantrasyonunu artırır. Böylece konak hücre iskelet yapısının bozulmasına, endotel hücrelerinde geçirgenliğin artmasına neden olur (42).

### ***Biyofilm***

Mikroorganizmaların oluşturduğu, herhangi bir yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matrikstir. *P. aeruginosa*, bu sayede konak immun sisteminden korunur, fagositozdan kaçır, besin yoksunluğuna, pH değişikliklerine, oksijen radikallerine, çeşitli antibiyotiklere, dezenfektanlara karşı direnç geliştirir ve yabancı cisim enfeksiyonlarına neden olur (44, 45).

### ***Quorum Sensing (QS)***

Bakterilerin hücreden hücreye iletişim sinyalleri ile buldukları ortamdaki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirmelerine olanak sağlayan sisteme quorum sensing ya da çoğunluğu algılama denir. Birbiri ile ilişkili ve sinyaller ile düzenlenen *las*, *rhl* ve son yıllarda tanımlanmış olan *kinolon* olmak üzere üç QS sistemi bulunmaktadır. Bu sistemin *P. aeruginosa*'nın çeşitli virülans faktörlerinin üretimini düzenlediği bilinmektedir. Bu şekilde bakteri bulunduğu ortam koşullarına göre fenotipik değişiklikler gösterir ve çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirir (26, 46, 47).

### ***Patogenez***

Deri ve mukozanın çeşitli nedenlerden dolayı bütünlüğünün bozulması, *P. aeruginosa*'nın invazyonuna ve dolayısıyla enfeksiyonun oluşmasına zemin hazırlar.

Özellikle damar içi ya da üriner kateteri olan hastalarda, endotrakeal tüp kullanımında, deride gelişen yanıklarda ve diğer çeşitli yara yerlerinde enfeksiyon oluşma riski artmıştır (4). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların patogenezi bakterinin hem invazif hem de toksinojenik etkisi nedeniyle oldukça karmaşık ve çeşitlidir. Bu enfeksiyonlar üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada bakteriyel tutunma ve kolonizasyon, ikinci aşamada lokal yerleşme ve invazyon ve son aşamada sistemik yayılım ve sistemik hastalık meydana gelir. Her bir basamak için bir önceki gereklidir. Fakat hastalık gelişimi herhangi bir basamakta durabilir. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri, patogenezin her bir basamağını düzenler ve karakteristik enfeksiyon bulgularından sorumludur (20, 48).

### **Epidemiyoloji**

*P. aeruginosa*, minimal beslenme maddelerine ihtiyaç duyması nedeniyle distile su içinde bile çoğalabilir. Yüksek sıcaklığa ve diğer farklı fiziksel şartlara uyum göstermesi sayesinde hastanelerde fırsatçı patojen olarak önemli bir role sahiptir. Nemli ortamları sevmesi nedeniyle insanlarda aksillada, perinede ve kulakta, hastanelerde ise solunum destek sistemlerinde, temizleme solüsyonlarında, ilaçlarda, dezenfektan maddelerinin içinde kolaylıkla ürer. Tuvalet ve banyo gibi nemli ortamlar, hastane atıkları, paspaslar, çiğ sebzeler ve hatta hasta odalarındaki çiçekler, *P. aeruginosa* enfeksiyonları için potansiyel kaynaklardır. Ayrıca yüzme havuzu, küvet, jakuzi, sauna gibi nemli ortamlar ve kontak lens solüsyonları da enfeksiyon riski açısından hastane dışı rezervuarlardır (4, 20, 48).

### ***P. AERUGINOSA* ENFEKSİYONLARI**

*P. aeruginosa*, insanların normal florasında da bulunabilir. Ancak hastane dışındaki ya da hastaneye başvuran sağlıklı kişilerde bu oran düşüktür. Oysa hastaneye yatan özellikle yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı olan hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal yolunda ve antibiyotik alan hastaların herhangi bir bölgesinde kolonizasyon sıklığı artar. Klinikte ise kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımını yapmak genellikle zordur. İzole edilen bakterinin virülans potansiyellerini değerlendirebilmek için kullanılacak bir tanı aracı henüz mevcut değildir (20, 49). *P. aeruginosa*, hastane kaynaklı pnömoni,

idrar yolu enfeksiyonu, cerrahi yara yeri enfeksiyonu, yanık sonrası enfeksiyonları ve bakteriyeminin önemli nedenidir. Entübe hastalarda ventilatörle ilişkili ölümcül seyredilen pnömonilerde en önemli etken patojendir (48, 50).

### **Solunum Sistemi Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*'nın neden olduğu pnömoninin klasik özelliği, bağışıklık sistemi baskılanmış olanlarda görülmesi ve akciğerlerde hemoraji ve nekroza neden olmasıdır. Toplum kökenli *P. aeruginosa* pnömonisinde enfeksiyonun kaynağı üst solunum yollarına kolonize olmuş bakterilerdir. Özellikle kistik fibrozlu hastalar ve kronik akciğer hastalığı olanlar ciddi risk altındadırlar. Hastane kaynaklı pnömoni ise nebulizatör ya da mekanik ventilatör kullanımı ile ilişkilidir. Kronik akciğer hastalığı olanlarda daha öncesinde meydana gelen kolonizasyon hastane kaynaklı pnömoniye neden olabilir. Ayrıca bronkoskopların kontaminasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan epidemiler de bildirilmiştir (51). Kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde meydana gelen fizyopatolojik değişimler *P. aeruginosa*'nın burada kolonize olmasına zemin hazırlar. Bu hastalarda tekrarlayan ve kalıcılık gösteren akciğer enfeksiyonlarına neden olur (52).

### **Bakteriyemi**

*P. aeruginosa*'nın neden olduğu bakteriyemi, hastanede yatan ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda görülmektedir. Son yıllarda mortalitesinde artış gözlenmiştir. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda, mekanik ventilasyon desteği alanlarda, akut solunum yetmezliği gelişen hastalarda, santral venöz kateteri olanlarda ve bakteriyeminin kaynağı solunum yolu olan hastalarda artmış mortalite oranları görülmektedir (53,54).

### **Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları**

Deri bütünlüğünün bozulduğu özellikle yanık, travma, dekübit ülserleri ya da dermatit gibi durumlarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu deri lezyonları meydana gelebilir. *P. aeruginosa* bakteriyemisi sırasında ektima gangrenozum denilen karakteristik deri lezyonları gelişebilir. Ayrıca bakteriyemi ile ilişkili olarak subkutan nodüller, gangrenöz selülit, hemorajik vezikül, papül, derin abse, peteşi, prupura,



makül, bül ve nekrozitan fasit gibi birçok deri lezyonları ve yumuşak doku enfeksiyonları görülebilir (48, 55, 56). *P. aeruginosa* yenidoğanlarda, prematürelde ve düşük doğum ağırlığı olanlarda noma neonatorum adı verilen ağız, burun ve anal bölgede mukokutanöz alanları tutan gangrenöz bir enfeksiyona neden olur (57).

### **Üriner Sistem Enfeksiyonları**

Çoğunlukla hastane kökenli ve iyatrojeniktir. Kateterizasyon, *P. aeruginosa*'ya bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında en sık nedendir. Diğer predispozan faktörler arasında cerrahi, anatomik defekt, obstrüksiyon, vezikoüreteral reflü, diabetes mellitus gibi metabolik bozukluklar, organ nakli olanlar ve bağışıklık yanıtı baskılanmış hastalar sayılabilir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu bakteriyemiler, %40 gibi yüksek oranda üriner sistemden kaynaklanmaktadır. Ayrıca başka bir primer odaktan bakteriyemi ile üriner sistem enfeksiyonu gelişebilir (48, 58).

### **Göz Enfeksiyonları**

Kontak lens kullanımı, travma, yaralanma, cerrahi, yanıklar *P. aeruginosa*'nın neden olduğu göz enfeksiyonları ile yakından ilişkilidir. Ayrıca entübe edilmiş hastalarda göz kuruluşuna bağlı olarak gelişen ülserin bakteri ile kontaminasyonu da enfeksiyona neden olabilir. Sıklıkla keratite neden olur. Daha nadir olarak endoftalmit ve özellikle nötropenik hastalarda orbital selülit gelişebilir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu korneal enfeksiyon, körlük ve görme bozukluğunun önemli bir nedenidir (4, 59).

### **Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*, kanserli hastalarda *Listeria monocytogenes*'den sonra ikinci sıklıkta menenjit etkeni ve *Escherichia coli*'den sonra ikinci sıklıkta beyin apsesi nedeni olarak bildirilmektedir (20). Farklı yollarla enfeksiyona neden olabilir. Bunlardan birincisi kafa travması, cerrahi, invazif tanısal girişimler ile subaraknoidal aralığa ya da beyine direkt inokülasyon. Diğeri ise kulak, mastoid veya paranasal sinus gibi bir kaynaktan komşuluk yoluyla ya da üriner sistem, endokard, akciğer gibi uzak bir kaynaktan bakteriyemi sırasında yayılım olabilir. Pseudomonal menenjit yüksek mortalite oranlarına sahip olması nedeniyle önemlidir (48, 60).

### **Kulak Enfeksiyonları**

*P. aeruginosa*, akut diffüz otitis eksterna yada yüzücü kulağı da denilen tablonun en önemli patojenidir. Özellikle diabetes mellitusu olan hastalarda gelişen ve hayatı tehdit edici potansiyeli olan malign eksternal otitin en sık nedenidir. *P. aeruginosa* ayrıca kronik otitis media etkenidir (61, 62, 63).

### **Kemik ve Eklem Enfeksiyonları**

Hematojen yayılım ile meydana gelen enfeksiyonlar daha çok intravenöz ilaç bağımlılarında üriner sistem veya pelvik enfeksiyonu takiben gelişir. Penetre edici bir travma, cerrahi girişim yada yumuşak doku enfeksiyonunu takiben komşuluk yolu ile yayılım görülebilir. *P. aeruginosa*, ayakta meydana gelen delici yaralanmalardan sonra osteokondrit, osteomyelit ya da septik artrit gelişmesine neden olabilir. Bu durum özellikle çocuklarda, sporculara ve diabetes mellitusu olanlarda meydana gelir (48, 64, 65).

### **Gastrointestinal Enfeksiyonlar**

Enfeksiyon genellikle yenidoğanlarda ve kemoterapiye sekonder nütropeni gelişen hematolojik malignitesi olan hastalarda ortaya çıkar. Obstrüksiyon gibi gastrointestinal bozukluklarda, cerrahi müdahalelerde ve *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan yoğun bakım hastalarında gastrointestinal kolonizasyon görülebilmektedir. *P. aeruginosa*, yeni doğanlarda ve nütropenik hastalarda mortalitesi yüksek bir klinik tablo olan nekrotizan enterokolite neden olur (48, 66, 67).

### **ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK**

*P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler, bakterinin intrinsek direnç özellikleri nedeniyle kısıtlıdır. Üreidopenisilinler ve karboksipenisilinler gibi antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozidler ve kinolonlar güvenilir antibakteriyel etkinlikleri nedeniyle sık kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır (68, 69).

Tedavi sırasında gelişebilecek direnç nedeniyle karboksipenisilinler, üreidopenisilinler, 2. ve 3. kuşak sefalosporinler ve aztreonam gibi antimikrobiyal ajanların tek başlarına kullanılmaları önerilmemektedir (70, 71).

Karbapenemler bakteriyel dirence karşı geliştirilmiş en geniş spektrumlu etkin beta laktam antibiyotiklerdir. Özellikle son yıllarda *P. aeruginosa* izolatlarında görülen karbapenem direncinin sorun yaratabileceği göz ardı edilmemelidir (49, 72).

Aminoglikozidler arasında amikasin, aminoglikozid modifiye edici enzimden daha az oranda etkilenmesi nedeniyle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında grubun diğer üyelerine göre daha etkin olarak bildirilmektedir (6, 68).

Kinolon grubu antimikrobiyal ilaçlar arasında, *P. aeruginosa* dahil hastane kökenli gram negatif bakterilere en etkili olan antibiyotik siprofloksasindir. Tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılabilir (2, 73).

Son yıllarda çoklu ilaç direnci olan *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin (polimiksin E) yeni bir alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kolistin intravenöz kullanılmakla birlikte, pnömonide ek olarak inhalasyon yolu ile, menenjitte ise intratekal kullanımı mevcuttur. Tigesiklin ise in vitro çalışmalarda *P. aeruginosa* üzerine etkili bulunmamıştır (74, 75).

*P. aeruginosa* yapısal özelliklerinden dolayı çabuk direnç geliştirebilen bir bakteridir. Yanlış ve uygunsuz antibiyotik kullanımı, direnç gelişimini artırmaktadır. Hastanelerde rasyonel olmayan yoğun antibiyotik kullanımı bu dirençli suşların seçilmesine neden olmuştur. Yoğun antibiyotik baskısına bağlı bakterilerin direnç geliştirmesi kaçınılmaz bir durumdur. Son yıllarda çoklu antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşlarının artması, bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavilerinde sorun yaşanmasına neden olmaktadır (75-77).

*P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisi sırasında ortaya çıkabilecek direnç gelişimini önlemek ve geniş etki spektrumunu sağlamak amacıyla kombinasyon tedavileri önerilmektedir. Genellikle tercih edilen ise beraber kullanıldıklarında sinerjik etki gösteren bir beta-laktam antibiyotik ile aminoglikozid veya kinolon kombinasyonudur. Ancak karbapenem ve kinolon kombinasyonunun antagonistik etkili de olabileceği unutulmamalıdır (68, 72, 75, 76).

SENTRY antimikrobiyal surveyans programının 1997-2007 yılları arasında 25.460 *P. aeruginosa* izolatı ile yaptıkları bir çalışmada piperasilin-tazobaktamın Avrupa ve Latin Amerika ülkelerinde en etkili, Asya ve Kuzey Amerikada ise ikinci en etkili antipsödomonal ilaç olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada

farklı coğrafi bölgelerde antibiyotiklerin farklı duyarlılık oranlarına sahip olduğu görülmektedir (78).

Antibiyotiklerin duyarlılık oranları hastaneden hastaneye, aynı hastane içindeki servisler arasında hatta aynı servis içinde yıldan yıla değişebileceği unutulmamalıdır. Antimikrobiyal ajanların direnç profilleri o hastanenin yapısı, enfeksiyon kontrolü, hastaların özellikleri, hastanedeki invaziv girişim sıklığı ve en önemlisi antibiyotiklerin kullanım politikasına göre değişebilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı her hastane kendi izolatlarını düzenli olarak takip etmeli, rutin antimikrobiyal tedavide yer alan antibiyotiklere karşı direnç oranlarını belirlemeli ve kendi tedavi protokollerini bu sonuçlara göre düzenlemelidir. Bu sayede artan direnç oranlarının önüne geçilmiş ve dirençli bakteri yayılımı engellenmiş olur (72, 76, 79-82).

### **ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI**

*P. aeruginosa*, çeşitli mekanizmalarla antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu direnç mekanizmalarının başlıcaları şunlardır (83);

- 1) Aktif pompa sistemlerinin uyarılması ve yüksek düzey ekspresyonu
- 2) Dış membran geçirgenliğinin azalması
- 3) Hedef yapısında değişiklik olması
- 4) İlacı inaktive eden enzimlerin üretimi

#### **1) Aktif Pompa Sistemlerinin Uyarılması ve Yüksek Düzey Ekspresyonu**

Aktif pompa sistemleri, antibiyotiklerin hücre dışına atılmasını sağlayarak hücre içi ilaç konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır. Bu sistemde ATP binding cassette (ABC) family, small multidrug resistance family, major facilitator superfamily, resistance-nodulation-division (RND) family, multidrug ve toxic compound extrusion family gibi beş üst-aile tanımlanmıştır. Bu beş sistem *P. aeruginosa*'da bulunmakla beraber RND ailesi en yaygın olan sistemdir. RND pompaları, periplazmik membran füzyon proteini (MFP), dış membran faktörü (OMF) ve sitoplazmik membran RND taşıyıcısı olmak üzere üç yapıdan oluşmaktadır (83, 84).

RND ailesinde iki tanesi divalent metal katyon transporter olmak üzere toplam 12 tane sistem tanımlanmıştır. Diğer 10 sistem; MexAB-OprM, MexCD-OprJ,

MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OpmE, MexMN ve TriABC'dir (84).

*P. aeruginosa*, sahip olduğu aktif dışa pompalama sistemleri sayesinde kloramfenikol, novobiosin, trimetoprim, sũlfonamid, beta-laktam, beta-laktam inhibitœrleri, florokinolon, aminoglikozid, tetrasiklin, ve makrolid grubu antibiyotiklerin etkisinden kendisini korur ve bu sayede çoklu ilaç direncine sahip olur (84). Aktif pompa sistemleri, bir operon ¼zerinde d¼zenlenmiř genlerle kodlanırlar. Bu genler, d¼zenleyici başka bir genin kontrol¼ altındadırlar. Aktif pompa sistemleri, d¼ř¼k seviyede dirençten sorumludurlar ancak y¼ksek seviyede dirençten sorumlu mutantların seleksiyonuna neden olmaktadır (84, 85).

## 2) Dış Membran Geçirgenliğinin Azalması

Porinler, *P. aeruginosa*'nın dış membranında bulunan protein yapısında olan içi su dolu kanalcıklardır. Antibiyotiklerin şekli, b¼y¼kl¼đ¼, y¼k¼ ve hidrofilik œzellikleri porinlerden geçişini etkileyen faktœrlerdir. Beta-laktam antibiyotiklerin çođ¼ hidrofilik yan zincirler içerdiklerinden dolayı porin proteinlerindeki değişimlerden etkilenmektedirler. Sonuç olarak porinlerle ilgili değişimler bakterinin beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (86).

OprF, *P. aeruginosa*'nın spesifik olmayan genel en b¼y¼k dış membran proteindir. Bunun dışında substrata œzg¼ ve spesifik birçok dış membran proteinleri *P. aeruginosa*'da mevcuttur. Bunlardan bir tanesi de OprD dış membran porin proteindir. OprD, temel aminoasitlerin ve karbapenemlerin girişini sağlayan œzg¼l bir kanaldır. OprD'nin azalması ya da kaybı sœz konusu olduğunda, œzellikle imipeneme dirençli, meropeneme dirençli ya da duyarlı olabilen *P. aeruginosa* suşları ortaya çıkmaktadır (85-87).

## 3) Hedef Yapısında Değişiklik

Florokinolonlar, *P. aeruginosa*'da bulunan DNA giraz ve topoizomeraz-IV gibi enzimleri hedef alarak etkinliklerini gœsterirler. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki spontan mutasyonlar sonucunda œzellikle bu enzimlerin GyrA alt ¼nitelerinde meydana gelen değişimler florokinolonlara karşı direncin gelişmesine neden olmaktadır (88). *P. aeruginosa*'da, değişime uğramış penisilin bağlayan

proteinler (PBP), beta-laktamlarla tedavi sırasında oluşan direnç gelişimi ile nadir de olsa ilişkilidir. PBP-3 üreten *P. aeruginosa* suşlarının, beta-laktam antibiyotiklere olan duyarlılığında azalma meydana gelmektedir. (83, 85).

#### **4) İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi**

Asetiltransferazlar, fosfotransferazlar ve adeniltransferazlar gibi aminoglikozid modifiye edici (AME) enzimler, *P. aeruginosa*'nın periplazmik aralığında veya sitoplazmasında bulunurlar. Ekstraselüler olarak salınmazlar ve hücre içine girmemiş antibiyotikleri etkilemezler. Bu enzimler antibiyotikleri kesin olarak inaktive etmezler ancak aminoglikozidlerin hücre içine girişini zayıflatırlar ve ribozomlara bağlanmalarını inhibe ederler (89, 90).

*P. aeruginosa* suşlarında beta-laktamaz üretimi, antibiyotik direnç gelişiminde en önemli mekanizmadır. Bunlar AmpC tipi beta-laktamazlar, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve karbapenemazlar olarak bilinmektedir (3, 91).

#### **BETA-LAKTAMAZLAR**

Beta-laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Bu enzimler beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağını bozarak etki gösterirler (92).

Beta-laktamazlar ilk olarak 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından *Escherichia coli* suşunda penisilini parçalayabilen bir penisilinazın varlığının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir. Günümüzde ise binden fazla beta-laktamaz tanımlanmıştır (92, 93).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında iki tane şema kullanılmaktadır.

1) Moleküler sınıflama, aminoasit dizisini esas almaktadır ve beta-laktamazları sınıf A, B, C ve D şeklinde dört gruba ayırmaktadır. Sınıf A, C ve D'de yer alan enzimler beta laktam hidrolizi için serini kullanırken, sınıf B'de ise substrat hidrolizi için çinko iyonuna ihtiyaç duyan metalloenzimler yer almaktadır.

2) Fonksiyonel sınıflama, ilk kez 1995 yılında Bush ve Jacoby tarafından substrat ve inhibitör profiline göre yapılmış fenotipik sınıflamadır. 2009 yılında yine aynı araştırmacılar tarafından güncellenmiş olan şema Tablo-1'de gösterilmiştir (94).

*P. aeruginosa*'nın ürettiği indüklenebilir beta-laktamazlar Bush-Jacoby sınıflamasında sınıf 1 (moleküler sınıf C)'de, genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar sınıf 2 (moleküler sınıf A ve D)'de, karbapenemazlar ise sınıf 3 (moleküler sınıf B)'de ve sınıf 2'de (moleküler sınıf A ve D)'de yer almaktadır (94).

**Tablo 1.** Beta-laktamazlar için sınıflandırma şeması (94)

Bush-Jacoby grup (2009)	Moleküler sınıf	Özgün substrat	İnhibisyon		Temsil eden Enzimler
			CA/TZB	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	Yok	Yok	<i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Sefalosporinler	Yok	Yok	GC1, CMY-37
2a	A	Penisilinler	Var	Yok	PC1
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	Var	Yok	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, Monobaktamlar	Var	Yok	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penisilinler	Yok	Yok	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, Monobaktamlar	Yok	Yok	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	Var	Yok	PSE-1, CARB-3,
2ce	A	Karbenisilin, sefepim	Var	Yok	RTG-4
2d	D	Kloksasilin	D	Yok	OXA-1, OXA-10
2de	D	Geniş spektrumlu sefalosporinler	D	Yok	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler	D	Yok	OXA-23, OXA-48
2e	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Var	Yok	CepA
2f	A	Karbapenemler	D	Yok	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Karbapenemler	Yok	Var	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B	Karbapenemler	Yok	Var	CphA, Sfh-1

(CA: klavulanik asit, TZB: tazobaktam, *E.coli*: *Escherichia coli*, D: değişken)

## İndüklenebilir Beta Laktamazlar

*P. aeruginosa*'nın ürettiği sınıf 1 beta-laktamazlar (Kromozomal ampC tipi enzimler) indüklenebilir özelliktedir. İndüklenebilir beta-laktamaz (İBL) yapısal (ampC) genleri, aktivatör represör genler (ampR) ve baskılayıcı (ampD) genlerin etkisi altındadır. Normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenen bu enzimler ortamda bulunan bir indükleyici antibiyotiğin etkisi ile yüksek miktarlarda sentezlenmeye başlarlar. Farklı beta-laktam antibiyotiklerin bu beta-laktamazları indükleme yeteneği ve indükledikleri enzimlere dayanıklılıkları farklıdır (71, 86, 95).

İndüksiyon etkisi normalde geçici olup indükleyicinin etkisi ortadan kalkınca tekrar bazal düzeye dönlür. Ancak buradaki esas sorun indüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda beta-laktamaz üreten stabil dereprese mutantların tedavi sırasında seçilme riskidir (70, 86). Dereprese mutantlar, İBL sentezleyen bakteri popülasyonunda  $10^5$ - $10^7$  sıklığında bulunurlar. Zayıf indükleyici bir antibiyotik ile tedavi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması ve antibiyotik etkisine dirençli dereprese mutantların ortamda çoğalması ile tedavi başarısızlıkları meydana gelmektedir (95).

İmipenem, klavulanik asit kombinasyonları, sefoksitin ve sefotetan gibi antimikrobiyal ajanlar güçlü indükleyicilerdir. İkinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, aztreonam, üreidopenisilinler ve karboksipenisilinler ise zayıf indükleyicilerdir. Karbapenemler, hem indükleyici hem de dereprese mutantlara etkili olduğu için seleksiyona yol açmazlar (95). Ancak bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (86).

Laboratuvarlardan İBL sonucunun bildirilmediği durumlarda da, *P. aeruginosa*'nın bu özellikte olduğu ve duyarlılık testlerinde 'yalancı duyarlı' olarak görülebilecekleri unutulmamalıdır (70, 86).

*P. aeruginosa* dışında kromozomal ampC tipi indüklenebilir beta laktamaz üreten diğer bakteriler arasında *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Providencia stuartii* ve *Acinetobacter baumannii* yer almaktadır (96).



## **Karbapenemazlar**

Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasında grup 1'de (moleküler sınıf A ve D)'de yer alan karbapenemazların aktif bölgelerinde serin bulunmaktadır ve klavulanik asite olan duyarlılıkları değişkendir. Fonksiyonel sınıflamada grup 3'de (moleküler sınıf B)'de yer alan karbapenemazlar ise aktif bölgelerinde çinko iyonu taşırlar ve klavulanik asite dirençlidirler. Bu gruptaki enzimler metallo-beta-laktamazlar (MBL) olarak bilinirler (94).

İlk olarak 1991 yılında Japonya'da MBL (IMP-1) üreten *P. aeruginosa*'nın bildirilmesinden sonra Japonya başta olmak üzere çeşitli Asya ve Avrupa ülkelerinden gram negatif çomaklarda özellikle *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, yeni MBL'ler (IMP, VIM, GIM, SPM, NDM-1) bildirilmiştir ve son yıllarda sayıları artarak dünya çapında yayılma göstermektedir. MBL'leri kodlayan genler kromozom ya da plazmid aracılı olabilir ve sınıf 1 integronlar üzerinde yer alır. Bu nedenle bakteriler arasında hızla yayılabilir. Aktarılabılır MBL'lerin bulunmasıyla karbapenemlere direnç gelişimi ile ilgili endişeler artmıştır. MBL üreten bakterilerin erken ve doğru olarak saptanması bu bakterilerin kontrolsüz yayılımlarının sınırlandırılmasına yardımcı olacaktır (95, 97).

Karbapenemaz üreten bakterilerin karbapenem MİK değerlerinin düşük kalabilmesi karbapenemlerin saptanmasında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde ve *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere azalmış duyarlılık saptanması karbapenemaz varlığı açısından önemlidir. *P. aeruginosa* suşlarında ise karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık saptanması durumunda karbapenemazlarla beraber farklı mekanizmalarla da karbapenem direnci olabileceği unutulmamalıdır (98).

Karbapenemlerden herhangi birisine azalmış duyarlılık bulunması durumunda karbapenemaz varlığı araştırılmalıdır. Bu amaçla şüpheli olan suşa Modifiye Hodge Testi (MHT) yapılmalıdır (95). MHT, CLSI (M100-S21)'de rutin hastalar için kullanılması önerilmemektedir. Ancak epidemiyolojik çalışmalar ve enfeksiyon kontrol amacıyla bu testin kullanılması tavsiye edilmektedir (99). Ayrıca MBL aktivitesinin EDTA ve 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatörler ile inhibe olma özelliklerinden yararlanılarak bu enzimleri erken tanıyabilecek tarama amaçlı basit fenotipik yöntemler de geliştirilmiştir (95).

## Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin 1980’li yılların başlarında klinik kullanıma girmesinden hemen sonra geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz edebilen plazmid aracılı beta-laktamazlar ilk kez 1983 yılında rapor edilmiştir (100).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)’lar, penisilinleri, birinci, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz edebilen, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan ve aktif bölgelerinde serin bulunan beta-laktamazlardır. Karbapenemleri ve sefamisinleri etkilemezler. Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasında grup 2 (moleküler sınıf A ve D)’de yer alan GSBL’lerin günümüzde sayıları 600’ü geçmiştir (94, 100).

Klinik örneklerden çoğunlukla izole edilen TEM, SHV ve CTX-M gibi beta-laktamazların ve bunların türevlerinin dışında da ayrıca son yıllarda sayıları giderek artan çeşitli GSBL’ler de gündeme gelmiştir. Bunlar arasında PER, OXA, VEB, GES, BES, SFO, BEL ve TLA gibi beta-laktamazlar yer almaktadır (Tablo 2). Bu enzimlerin coğrafi çeşitlilik göstermesi dikkat çekicidir. Ayrıca GSBL genlerinin plazmidler üzerinde çok sayıda antibiyotik direnç genleri ile birlikte taşınması, direnç spektrumunu oldukça genişletmekte ve birbirinden bağımsız birçok antibiyotiğin tedavide etkisiz kalmasına neden olmaktadır (101, 102).

**Tablo 2.** Plazmid aracılı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (101)

Beta-laktamaz adı	İlk kez tanımlandığı yıl	Varyant sayısı	Aldığı ismin kökeni
SHV	1983	>100	Sulphhydryl variable
TEM	1985	>160	Hasta ismi: Temoneira
CTX-M	1989	>65	Sefotaksim- Münih
PER	1991	3	<i>Pseudomonas</i> extended resistance
VEB	1996	5	Vietnam extended spectrum beta-lactamase (ESBLs)
OXA	1991	>9	Oksasilin hidrolizi > penisilin
TLA-1	1991	1	Tlahuicas (kabile ismi)
BES-1	1996	1	Brazilian ESBLs
GES	1998	9	Guyana ESBLs
BEL-1	2005	1	Belgium ESBLs
SFO-1	1988	1	<i>Serratia fonticola</i>
TLA-2	2005	1	TLA-1 ile %51 aminoasit benzerliği

### **TEM ve SHV Türevi GSBL'ler**

TEM ve SHV türevi GSBL'ler, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi enzimlerden nokta mutasyonu ile köken almış, geniş spektrumlu beta-laktamları hidrolize edebilen enzimlerdir. *Enterobacteriaceae* ailesinde sık bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'da ise daha nadir görülürler. Yapılan çalışmalarda TEM ve SHV türevi enzimlerin *P. aeruginosa*'ya *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerden plazmid aracılı gen transferi ile geçtiği bildirilmiştir. TEM türevi enzimlerden TEM-42, TEM-4, TEM-21 ve TEM-24, SHV türevi enzimlerden ise SHV-5 ve SHV-12 *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir (11, 86).

### **CTX-M**

CTX-M grubu beta-laktamazların özellikle son yıllarda oldukça yaygınlaştığı bildirilmektedir. Mobil genetik elemanları (ISEcp1 veya ISCR1) ve plazmidleri (IncFII, IncN, IncL/M, IncI1) ile beraber başarılı klonları sayesinde tüm dünyada hızla yayılarak pandemilere neden olmaktadır. Ayrıca CTX-M üreten bakterilerde aminoglikozid ve florokinolon direncinde beraberinde görülebiliyor olması bu tür bakterilerin seleksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Bu gruptaki beta-laktamazların sefotaksime olan etkisi seftazidime oranla daha fazladır (103).

CTX-M grubu beta-laktamazlar çoğunlukla *Enterobacteriaceae* ailesinden rapor edilmiştir. Bununla beraber CTX-M üreten ilk *P. aeruginosa* suşu 2004 yılında Amsterdam'da kistik fibrozisli bir hastadan izole edilmiştir. Ayrıca aynı yıl Bolivya ve sonrasında Brezilya gibi farklı ülkelerden de bildirilmiştir. *P. aeruginosa*'da nadir görülmesinin nedenleri arasında plazmidlerin bu enzim genlerini taşımasındaki uyumsuzluk ve bakterinin CTX-M ekspresyonunu fenotipik olarak yansıtamaması sayılabilir (103).

### **PER-1**

Tipik bir GSBL enzimi olan ve moleküler sınıf A'da yer alan PER-1, penisilinleri, sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz eder. Bununla beraber karbapenemlere ve sefamisinlere karşı etkisizdir ve beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olur (11, 100, 101).

TEM ve SHV grubu enzimlerle %27, PER-2, VEB-1 ve TLA-1 ile %40 aminoasit benzerliği gösteren PER-1 enzimi en sık *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* tarafından üretilmektedir. Ayrıca *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* ve *Alcaligenes faecalis* gibi çeşitli bakterilerden de bildirilmiştir (100, 101 104).

PER-1 ilk defa 1991 yılında Fransa'da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda, kromozomal bir enzim olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra yapılan başka bir çalışmada PER-1'in 154 kb'den daha büyük bir plazmid üzerinde kodlandığı ve *P. aeruginosa* suşları arasında başarılı bir şekilde transfer edilebildiği gösterilmiştir (12, 13, 105).

PER-1'in moleküler sınıf A'da yer alan diğer enzimlerden farklı olarak türler arasında geçiş gösterebilmesi başta *Acinetobacter spp.* olmak üzere diğer türler için potansiyel bir risk oluşturmaktadır (104).

Fransa ve Türkiye'nin dışında İtalya, Polonya, Belçika, Macaristan, Romanya, uzakdoğu ülkelerinden ise Kore, Çin ve Japonya gibi birçok farklı ülkeden PER-1 üreten suşlar rapor edilmiştir. Hastane salgınlarına da neden olabilen PER-1 enziminin saptanması, yayılımının izlenmesi ve kontrolü önemlidir (11, 13, 100, 104, 106).

### ***OXA Türevi GSBL'ler***

Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasında grup 2d (moleküler sınıf D)'de yer alan OXA grubu enzimlerin en tipik özellikleri oksasilini ve kloksasilini, penisiline oranla %50 daha fazla hidrolize etmeleridir. Bu nedenle oksasilinaz olarak bilinirler. Bu enzimler *Enterobacteriaceae* ailesi dahil birçok gram negatif bakteri tarafından üretilmekle beraber daha çok *P. aeruginosa* suşlarında saptanmaktadır (11,100).

OXA tipi GSBL'lerin birçoğu OXA-10'dan türemiştir. Bunlar arasında OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-13 ve OXA-13 türevleri olan OXA-19 ve OXA-28 sayılabilir. OXA-15 ve OXA-32 ise OXA-2 ile yapısal ilişkisi olan oksasilinazlardır. Bunların dışında OXA-18 ve OXA-45 gibi herhangi bir enzimle ilişkisi olmayan OXA tipi GSBL'ler de mevcuttur (101).

*P. aeruginosa*'da bulunan OXA tipi GSBL'ler için beş farklı grup tanımlanmıştır. Grup I'de OXA-5, OXA-7 , OXA-10 ve türevleri, OXA-13 ve türevleri yer alır. Grup II'de OXA-2, OXA-3, OXA-15 ve OXA-20, grup III'de

OXA-1, OXA-4, OXA-30 ve OXA-31, grup IV'te tek bir enzim, OXA-9 bulunmaktadır. Grup V'te ise sadece LCR-1 enzimi yer almaktadır (11).

Çoğu OXA tipi beta laktamazların geniş spektrumlu sefalosporinlere olan etkileri zayıftır. Ancak bu enzimler, aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino sefalosporinleri hidrolize edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir. OXA-18 ve OXA-45 hariç bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler. Tıpkı PER-1'de olduğu gibi OXA tipi beta-laktamaz genlerinin de çoğu plazmid, transpozon ya da integron kontrolündedir (11, 101, 107).

OXA-10, birçok OXA tipi GSBL'ler ile yapısal ilişkisi olması nedeniyle bu grubun önemli bir üyesidir. OXA-10 türevleri ilk defa *P. aeruginosa* suşlarında ülkemizden bildirilmiştir. OXA-10 türevleri sıklıkla *P. aeruginosa*'da saptanmaktadır. OXA-10 enziminin sefotaksim, seftriakson ve aztreonam gibi antibiyotikleri hidroliz etme yeteneği zayıftır. Dolayısıyla bu antibiyotiklere karşı dirençten daha çok azalmış duyarlılığa neden olmaktadır. Ancak OXA-10 ve türevleri seftazidime karşı yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır (11, 100, 108).

### **VEB-1**

VEB-1 enzimi ilk defa 1996 yılında Vietnamlı bir hastadan izole edilen *E. coli* suşundan bildirilmiştir. PER-1 ile %40 aminoasit benzerliğine sahip olan bu enzim, *P. aeruginosa*'da ilk kez 1998 yılında Fransa'da saptanmıştır. VEB-1 enzimi özellikle seftazidime, sefotaksime ve aztreonama karşı yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır. Bununla beraber klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine oldukça duyarlıdır. VEB-1 genleri kromozomal olarak kodlanabilirler ayrıca plazmid ve integron üzerinde de bulunabilirler ve buradaki diğer direnç genleri ile ilişkilidirler. Bu sayede kinolon ve aminoglikozid direncine de neden olabilirler (11, 101, 109).

VEB-1 enzimi *P. aeruginosa*'dan başka *A. baumannii*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* gibi birçok gram negatif bakteride de saptanmıştır. Birçok farklı ülkeden VEB-1 üreten suşlar rapor edilmiştir. Seftazidim dirençli nozokomiyal *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına ve salgınlara neden olması bu enzimi önemli hale getirmiştir (11, 101).

## GSBL TANI YÖNTEMLERİ

### GSBL Tarama Testleri

CLSI, GSBL için tarama testi olarak disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerini önermektedir. Özellikle *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* ve *P. mirabilis* suşları için bu testlerin uygulanması önerilmektedir. Kullanılan antibiyotikler sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriaksondur. Birden fazla antimikrobiyal ajanın kullanılması testin duyarlılığını artırmaktadır. İnhibisyon zon çaplarının daraldığı ya da MİK değerlerinin yükseldiği durumlarda doğrulama testleri yapılmaktadır (99).

### GSBL Doğrulama Testleri

#### *Çift Disk Sinerji Testi*

Bu test amoksisilin-klavulanik asit (AMC) ile beta-laktam antibiyotikler arasında sinerjinin varlığını göstermeyi esas alan bir yöntemdir. Bu amaçla standartlara uygun bir şekilde bakteri ekimi yapılmış olan besiyeri plağının ortasına AMC diski ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 25 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefepim ve aztreonam diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra beta-laktam ve AMC diski arasında sinerjinin varlığına bakılır. Sefalosporinlerin veya aztreonamın etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi ya da arada bakterinin üremediği bir inhibisyon zonunun oluşması sinerjinin varlığı anlamına gelir. Aksi durum ise GSBL negatif olduğunu göstermektedir. Diskler arası uzaklığın 20 mm'ye düşürülmesi sinerji görülme oranını yükseltmektedir. Çok geniş zon çapları oluştuğunda ise uzaklık 30 mm'ye çıkarılabilir. Yapılan bir araştırmada AMC ile sinerji oluşturmada diskler arası mesafe farkı gözetmeksizin en duyarlı bulunan iki antibiyotik sefepim ve seftazidimdir (95, 110).

#### *Kombine Disk Testi*

CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği bu yöntemde seftazidim veya sefotaksim ve bu ajanların klavulanik asit ile kombinasyonları kullanılır.

Klavulanik asit ile kombine edilmiş diskin oluşturduğu zon çapının klavulanik asit içermeyen diskin oluşturduğu zon çapından 5 mm veya daha olması durumunda GSBL pozitif kabul edilir (99).

### ***E-Test Yöntemi***

Bu yöntemde üretici firmaların hazırladığı şeritler kullanılmaktadır. Bu şeritlerin bir ucunda üçüncü kuşak bir sefalosporin (sefotaksim ya da seftazidim) diğer ucunda ise aynı antimikrobiyal ajanın klavulanik asit ile kombinasyonu bulunmaktadır. Seftazidim ya da sefotaksim MİK değerinin seftazidim yada sefotaksim ile klavulanik asit kombinasyonu MİK değerinden sekiz kat veya daha fazla olması GSBL varlığını gösterir. Bazı durumlarda klavulanik asitin diğer tarafa da difüze olabilmesi nedeniyle şeritin ortasında görülen fantom zon ya da şeritin diğer tarafında görülebilen eliptik deformasyon zonu, MİK değerlerinden bağımsız olarak GSBL varlığını göstermektedir (95, 111).

### ***Üç Boyutlu Test***

Disk difüzyon yönteminin modifiye edilmiş şekli olan bu testte bakteri besiyeri plağına ekildikten sonra plağın merkezine yakın olacak şekilde dairesel bir yarık açılır. Yarığın içi bakterinin bulunduğu sıvı besiyeri ile doldurulur. Antibiyotik diskleri bu yarıktan 3 mm uzakta olacak şekilde yerleştirilir. Yarığa bakan tarafta inhibisyon zonlarında bozulma ya da daralma meydana gelmesi GSBL varlığını gösterir. Duyarlı ve yorumu kolay olan bu yöntem GSBL için özgül değildir. Ayrıca emek yoğun olması da bir diğer dezavantajdır (112, 113).

### ***Mikrodilüsyon Yöntemi***

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 8 kat veya daha fazla azalma GSBL varlığını gösterir (95).

### ***Moleküler Yöntemler***

GSBL varlığını saptamada kullanılan moleküler yöntemler; PCR (*polymerase chain reaction*), DNA probları, PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length*

*polymorphism*), PCR-SSCP (*PCR-single strand conformation polymorphism*), LCR (*ligase chain reaction*) ve nükleotid dizi analizidir. PCR kolay uygulanır ve gen ailesi için özgüldür. Bununla birlikte DNA probları da gen ailesi için özgüldür ancak emek yoğun bir yöntemdir. Oligotiplendirme özgül TEM türlerini saptayabilir ancak emek yoğunudur ve yeni türevleri saptayamaz. PCR-RFLP kolay uygulanır ve nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir. PCR-SSCP ve LCR ile çeşitli SHV türevleri ayırt edilebilir. Moleküler yöntemler arasında altın standart, nükleotid dizi analizidir. Bu yöntem tüm türevleri saptayabilmektedir. Ancak emek yoğun olması, teknik olarak zor bir yöntem olması ve yorumlanmasındaki güçlük önemli dezavantajlarıdır (113).

GSBL'nin varlığını saptamada piyasada mevcut olan çeşitli otomatize sistemlerde kullanılabilir. Ancak bu sistemlerin fenotipik yöntemlere göre GSBL'nin varlığını saptamadaki başarısı, özgüllükleri ve duyarlılıkları tartışma konusudur (111).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### SUŞLARIN İZOLASYONU VE SAKLANMASI

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Ocak 2011 – Şubat 2012 tarihleri arasında, ayaktan ve yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, standart yöntemler ile antibiyotik duyarlılık testleri çalışılmış ve *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmış olan laboratuvar izolatları çalışmaya dahil edildi. Her hastaya ait tek bir klinik örnekten izole edilen tek bir suş çalışmaya alındı. Toplamda 160 laboratuvar suşu ile bu çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* suşları, çalışma anına kadar uygun koşullarda saklandı. Çalışma sırasında suşlar %5 koyun kanlı besiyerine ekilerek bir gece 37 °C’de inkübe edildi. Taze kültürlerden elde edilen koloniler çalışmada kullanıldı. Nonfermentatif, oksidaz pozitif, aerop, hareketli, %5 koyun kanlı besiyerinde 37 °C’de üreyen, karakteristik kokusu olan ve Mueller-Hinton Agarda mavi-yeşil pigment yapan suşlar *P. aeruginosa* olarak tekrar tanımlanıp doğrulandı (20, 114).

### ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN SAPTANMASI

Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak saptandı. Bakterilerin 18-24 saatlik kültürlerinden 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonları ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml), Mueller-Hinton agar yüzeyine steril eküvyonla yayıldı. Antibiyotik diskleri agar üzerine yerleştirilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Antibiyotik diskleri çevresinde oluşan inhibisyon zonu ölçülerek izolatlar, duyarlı ve dirençli olarak kaydedildi. CLSI önerileri doğrultusunda gentamisin, amikasin, tobramisin, netilmisin, imipenem, meropenem, siprofloksasin, ofloksasilin, kolistin, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, aztreonam, seftazidim ve sefepim gibi antimikrobiyal ajanların duyarlılıkları saptandı. Çalışma sırasında kalite kontrol amacıyla standart suş olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı (99).

## GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

### Çift Disk Sinerji Testi

GSBL varlığını araştırmak için %5 koyun kanlı agara pasajlanan bakterilerin bir gecelik inkübasyonu sonrasında hazırlanan taze kültürlerinden 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonlarının Mueller-Hinton agar yüzeyine steril eküvyonla ekimi yapıldı. Besiyeri plağının tam ortasına amoksisilin-klavulanik asit diski ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefepim ve aztreonam diskleri yerleştirildi. Yirmidört saat 37 °C'de inkübasyon sonunda beta-laktam antibiyotiklerin etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskiye doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanı (inhibisyon zonu) bulunması GSBL pozitif, aksi durum ise GSBL negatif olarak yorumlandı. Çalışma sırasında pozitif kontrol suşu olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, negatif kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı (95, 115).

Besiyeri plağının merkezine yerleştirilen amoksisilin-klavulanik asit diski etrafına her iki diskin merkezinden merkezine uzaklığı birinci plakta 18 mm, ikinci plakta 13 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefepim ve aztreonam diskleri yerleştirilerek test tekrarlandı. (115).

### E-Test Yöntemi

GSBL saptamaya yönelik ticari olarak hazırlanmış olan E-test şeritleri (Biomerieux, Fransa) kullanıldı. Şeridin bir tarafında belirli konsantrasyonlarda (0.25-16 µg/ml) sefotaksim ve diğer tarafında ise sefotaksim/klavulanik asit (0.016-1 µg/ml + 4 µg/ml klavulanik asit) bulunmaktadır. Suşların bir gecelik taze kültürlerinden hazırlanan 0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton agar yüzeyine steril eküvyonla ekimi yapıldı. E-test şeritleri besiyeri üzerine yerleştirildi. Yirmidört saat 37 °C'de inkübasyon sonunda sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Sefotaksim MİK değerinin, sefotaksim-klavulanik asit MİK değerine oranının sekiz veya daha fazla olması GSBL pozitif olarak yorumlandı. Ayrıca şeritin ortasında görülen fantom zon ya da şeritin

diğer tarafında görülebilen eliptik deformasyon zonu, MİK değerlerinden bağımsız olarak GSBL pozitif olarak kabul edildi (95, 115).

### **PER-1, OXA-10 BENZERİ ve VEB-1 tip BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* suşlarının DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra PER-1, OXA-10 benzeri ve VEB-1 tip beta-laktamazlara ait genlerin varlığı daha önce tanımlanmış protokoller ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı (9, 107, 117).

#### **DNA Ekstraksiyonu**

*P. aeruginosa* suşlarının DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde bakteriler %5'lik koyun kanlı agarda bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen saf tek kolonilerden 1-2 koloni alınıp Brain Heart Infusion Broth (BHIB) içinde homojen süspansiyon haline getirildi. Bir gece 37 °C'de inkübasyondan sonra elde edilen bakteri süspansiyonundan bir ml alınarak ependorf tüpüne aktarıldı ve 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atıldı. Dipte kalan çökelti üzerine 200 µl distile su ilave edilerek 10 dakika kaynatıldı. Daha sonra tekrar 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve üstteki sıvıdan 150 µl alındı. Bu çözelti kalıp DNA olarak kullanılmak üzere çalışmanın yapılacağı zamana kadar uygun koşullarda saklandı (107).

#### **PER-1 Geninin Varlığının Araştırılması**

PER-1 geninin varlığını saptamak için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı (9, 107).

PERA: 5' ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC 3'

PERD: 5' AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA 3'

Çalışmada kullanılan PCR protokolü için amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı (116):

Distile su	29.75 µl
PCR tampon (10 x)	5 µl

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP mix (2 mM)	4 µl
PERA (100 pmol/ µl)	0.5 µl
PERD (100 pmol/ µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl
<u>Total DNA</u>	<u>5 µl</u>
TOPLAM	50 µl

Hazırlanan tüpler termal döngü cihazına (BIO–RAD MyCycler thermal cycler, USA) yerleştirildi ve PER-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için uygun program aşağıdaki gibi düzenlendi (107):

	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>	
Ön denatürasyon	94°C	10 dakika	
Denatürasyon	94°C	60 saniye	} 35 döngü
Primer bağlanması	42°C	60 saniye	
Primer uzaması	72°C	60 saniye	
Son uzama basamağı	72°C	7 dakika	

Elde edilen amplifikasyon ürünleri, 1X TBE tamponu içeren ve 5 µg/ 100 ml etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jeldeki kuyucuklara 10'ar µl olacak şekilde yüklendi. Daha sonra 100 voltta 30 dakika elektroforez cihazında (BIO-RAD ABD) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları, jel UV ışığında CCD kamera ile 'Gel Logic 2200 Kodak Imaging System' (Kodak, ABD) kullanılarak görüntülendi ve fotoğrafları kaydedildi. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı 100 bp DNA marker (Bioron – Germany) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. 926 bp büyüklüğünde bant görülmesi PER-1 geninin varlığı açısından pozitif olarak kabul edildi (104, 107, 108).

### **OXA-10 Benzeri Gen Varlığının Araştırılması**

OXA-10 benzeri gen (OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17) varlığını saptamak için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı (9, 107).

OPR1: 5' GTC TTT CGA GTA CGG CAT TA 3'

OPR2: 5' ATT TTC TTA GCG GCA ACT TAC 3'

Çalışmada kullanılan PCR protokolü için amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı (116):

Distile su	29.75 µl
PCR tampon (10 x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP mix (2 mM)	4 µl
OPR1 (100 pmol/ µl)	0.5 µl
OPR2 (100 pmol/ µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl
<u>Total DNA</u>	<u>5 µl</u>
TOPLAM	50 µl

Hazırlanan tüpler termal döngü cihazına (BIO–RAD MyCycler thermal cycler, USA) yerleştirildi ve OXA-10 benzeri gen bölgesinin amplifikasyonu için uygun program aşağıdaki gibi düzenlendi (9):

	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>	
Ön denatürasyon	94°C	10 dakika	
Denatürasyon	94°C	60 saniye	} 35 döngü
Primer bağlanması	55°C	60 saniye	
Primer uzaması	72°C	60 saniye	
Son uzama basamağı	72°C	10 dakika	

Elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1.5'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika elektroforez cihazında (BIO-RAD ABD) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları, jel UV ışığında görüntülendi ve fotoğrafları kaydedildi. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı 100 bp DNA marker (Bioron – Germany) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. OXA-10 benzeri genin varlığı açısından, 720 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi (9, 104, 108).

### VEB-1 Geninin Varlığının Araştırılması

Çalışmaya dahil edilen suşlarda VEB-1 geninin varlığını saptamak için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı (117).

VEB-F: 5' CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC 3'

VEB-B: 5' GGA CTC TGC AAC AAA TAG GC 3'

Çalışmada kullanılan PCR protokolü için amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı (116):

Distile su	29.75 µl
PCR tampon (10 x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP mix (2 mM)	4 µl
VEBF (100 pmol/ µl)	0.5 µl
VEBB (100 pmol/ µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl
<u>Total DNA</u>	<u>5 µl</u>
TOPLAM	50 µl

Hazırlanan tüpler termal döngü cihazına (BIO–RAD MyCycler thermal cycler, USA) yerleştirildi ve VEB-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için uygun program aşağıdaki gibi düzenlendi (117):

	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>
Ön denatürasyon	94°C	3 dakika
Denatürasyon	94°C	40 saniye
Primer bağlanması	54°C	40 saniye
Primer uzaması	72°C	45 saniye
Son uzama basamağı	72°C	5 dakika

} 30 döngü

Çalışma sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1.5'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika elektroforez cihazında (BIO-RAD ABD) yürütüldü.

Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları, jel UV ışığında görüntülendi ve fotoğrafları kaydedildi. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı 100 bp DNA marker (Bioron – Germany) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. VEB-1 geninin varlığı açısından, 642 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi (104, 108, 117).

### **RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) ANALİZİ**

Çalışmaya dahil edilen suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla RAPD analizi kullanıldı. Öncelikle suşların DNA ekstraksiyonu daha önce tanımlandığı gibi kaynatma yöntemi kullanılarak yapıldı (107). Daha sonra ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD PCR çalışıldı (9).

ERIC-2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

Çalışmada kullanılan RAPD PCR protokolü için amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı (116):

Distile su	30.25 µl
PCR tampon (10 x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP mix (2 mM)	4 µl
ERIC-2 (100 pmol/ µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl
<u>Total DNA</u>	<u>5 µl</u>
TOPLAM	50 µl

Hazırlanan tüpler termal döngü cihazına (BIO–RAD MyCycler thermal cycler, USA) yerleştirildi ve uygun amplifikasyonu protokolü aşağıdaki gibi düzenlendi (9):

	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>
Ön denatürasyon	94°C	5 dakika

Denatürasyon	94°C	60 saniye	} 35 döngü
Primer bağlanması	36°C	90 saniye	
Primer uzaması	72°C	3 dakika	
Son uzama basamağı	72°C	7 dakika	

Elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1.5'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika elektroforez cihazında (BIO-RAD ABD) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları, jel UV ışığında CCD kamera ile 'Gel Logic 2200 Kodak Imaging System' (Kodak, ABD) kullanılarak görüntülendi. Ortaya çıkan bantların profilleri, 100 bp DNA marker (Bioron – Germany) referans alınarak RAPD analiz programı (*Syngene Gene Directory Application – Version 2.01.02, İngiltere*) ile değerlendirildi (104, 108).

### **İstatistiksel Analiz**

Verilerin analizi SPSS (Statistical Packet for The Social Science, version 16) kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. P değerinin 0.05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Ocak 2011 – Şubat 2012 tarihleri arasında, ayakta ve yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 160 laboratuvar suşu çalışmaya dahil edildi. Suşların 146 (%91.25)'sı yatan hastalara, 14 (%8.75)'ü poliklinik hastalarına ait örneklerden izole edildi. Her hastaya ait tek bir klinik örnekten izole edilen tek bir suş çalışmaya alındı. Suşlar kan, yara, idrar, bronko-alveolar lavaj, balgam ve trakeal aspirat örneklerinden izole edildi. Suşların izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımları Tablo-3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı

Materyal	Sayı n (%)
İdrar	57 (35.6)
Yara	42 (26.3)
Trakeal aspirat	21 (13.1)
Balgam	21 (13.1)
Kan	15 (9.4)
Bronko-alveolar Lavaj	4 (2.5)
<b>Toplam</b>	<b>160 (100.0)</b>

Çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* suşları en sık Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine (%23.8) ait örneklerden izole edildi. Ayrıca sıklık sırasına göre suşların %10'u Pediatri bölümüne, %8.1'i Göğüs Hastalıkları Servisine, %8.1'i Kalp-damar Cerrahisi Servisine, %5.6'sı Üroloji Servisine, %5.6'sı Dermatoloji Servisine, %5.6'sı Plastik Cerrahi Servisine ve %33.2'si diğer servislere ait klinik örneklerden izole edildi.

### **Suşların Antibiyotik Duyarlılıkları**

Çalışmaya alınan 160 *P. aeruginosa* suşunun antibiyotik duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle değerlendirildi. En yüksek direnç oranları sırasıyla sefotaksimde %95.6, aztreonamda %41.2 ve piperasilinde %40.0 olarak görüldü.

Çalışmamızda en duyarlı antimikrobiyal ajan kolistin (%98.8) olarak saptandı. İkinci en yüksek duyarlılık oranı ise amikasinde (%90.0) izlendi. Çalışmamızda ayrıca beta-laktam grubu antibiyotikler arasında *P. aeruginosa*'ya karşı en duyarlı antimikrobiyal ajanın piperasilin/tazobaktam (%88.1) olduğu saptanmıştır. Tüm suşların çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılık oranları Tablo-4'te gösterilmiştir.

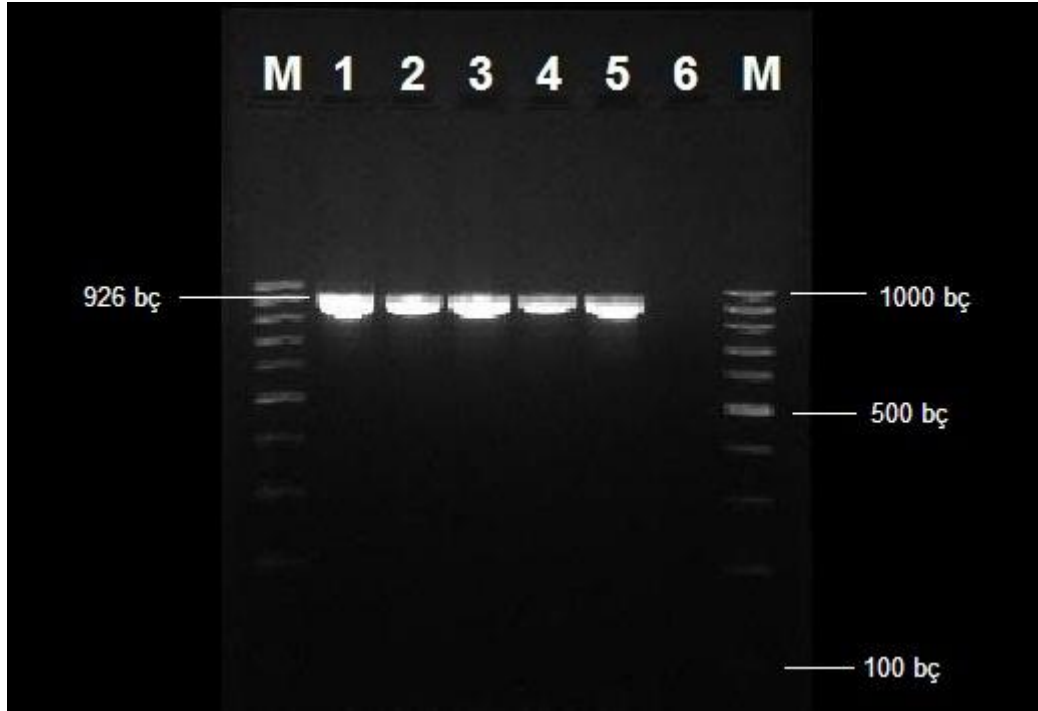
**Tablo 4.** *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
Gentamisin	136 (85.0)	24 (15.0)
Amikasin	144 (90.0)	16 (10.0)
Tobramisin	134 (83.8)	26 (16.2)
Netilmisin	137 (85.6)	23 (14.4)
İmipenem	132 (82.5)	28 (17.5)
Meropenem	136 (85.0)	24 (15.0)
Siprofloksasin	141 (88.1)	19 (11.9)
Ofloksasilin	130 (81.3)	30 (18.7)
Kolistin	158 (98.8)	2 (1.2)
Piperasilin	96 (60.0)	64(40.0)
Piperasilin/tazobaktam	141 (88.1)	19 (11.9)
Aztreonam	94 (58.8)	66 (41.2)
Sefotaksim	7 (4.4)	153 (95.6)
Seftazidim	116 (72.5)	44 (27.5)
Sefepim	128 (80.0)	32 (20.0)

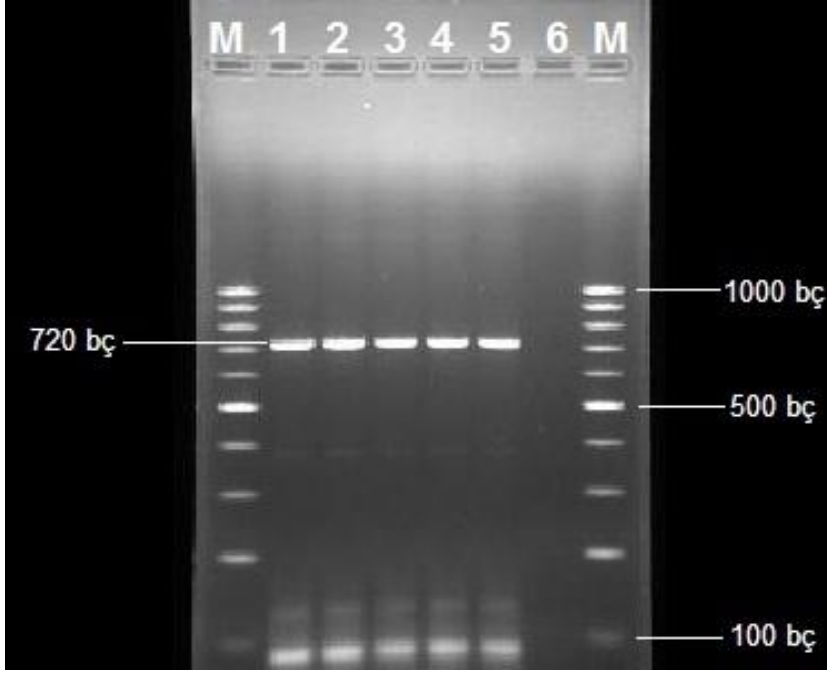
Çalışmaya alınan 160 *P. aeruginosa* suşunda, fenotipik olarak GSBL varlığını araştırmak için yapılan çift disk sinerji testinde pozitiflik saptanmadı. Aynı test amoksisilin-klavulanik asit diski ile etrafına yerleştirilen diğer diskler arasındaki mesafe 18 ve 13 mm olacak şekilde iki kez tekrar uygulandığında da çalışmaya alınan suşlarda pozitiflik saptanmadı.

GSBL'nin varlığını saptamaya yönelik bir diğer fenotipik yöntem olan E-test yöntemi çalışmaya alınan 160 suşa uygulandı. GSBL negatif olarak saptandı.

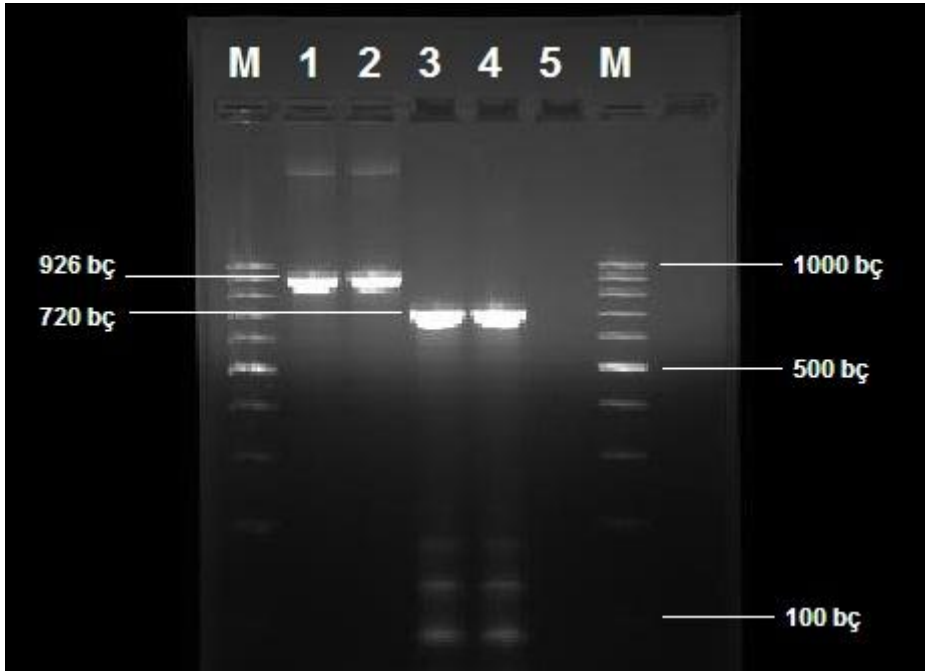
İzole edilen 160 *P. aeruginosa* suşunda genotipik olarak PER-1, OXA-10 benzeri ve VEB-1 tip genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının 6'sında (% 3.75) PER-1, 9'unda (% 5.6) OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı saptanmıştır. Toplam 2 suşta (% 1.25) ise PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda izlenmiştir. PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitif olan suşların PCR jel görüntüleri Şekil 1,2 ve 3'de gösterilmiştir. PCR yöntemiyle suşların hiçbirinde VEB-1 geni saptanmamıştır.



**Şekil 1.** *P. aeruginosa* suşlarında, PERA ve PERD primerleri ile saptanan *PER-1* (926 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri (M: 100 bç DNA ladder, 1-4: *PER-1* geni pozitif suşlar, 5:Pozitif kontrol, 6: Negatif kontrol).



**Şekil 2.** *P. aeruginosa* suşlarında, OPR1 ve OPR2 primerleri ile saptanan *OXA-10* (720 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri (M: 100 bç DNA ladder, 1-4: *OXA-10* geni pozitif suşlar, 5:Pozitif kontrol, 6: Negatif kontrol).



**Şekil 3.** *PER-1* (926 bç) ve *OXA-10* (720 bç) gen bölgesine ait PCR jel görüntüleri (M: 100 bç DNA ladder, 1-2: *PER-1* geni pozitif, 3-4: *OXA-10* geni pozitif suşlar, 5: Negatif kontrol).

PER-1 pozitifliği saptanan 6 suşun 2'si Çocuk Hastalıkları Servisine, 2'si Göğüs Hastalıkları Servisine, 1'i Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine ve diğer 1 suş ise Genel Cerrahi Servisine ait örneklerden izole edilmiştir. Suşların 2'si yara diğerleri ise balgam, idrar, bronko-alveolar lavaj ve trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiştir. Bu suşların hepsi seftazidime dirençli olarak saptanmıştır. Suşların izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları Tablo-5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** PER-1 pozitifliği saptanan 6 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları

Suş No	Servis	Materyal	Seftazidim duyarlılığı
62	Çocuk Hastalıkları Servisi	İdrar	Dirençli
111	Çocuk Hastalıkları Servisi	Yara	Dirençli
157	Göğüs Hastalıkları Servisi	Balgam	Dirençli
143	Göğüs Hastalıkları Servisi	Bronko-alveolar lavaj	Dirençli
133	Genel Cerrahi Servisi	Yara	Dirençli
71	Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal aspirat	Dirençli

OXA-10 pozitifliği saptanan 9 suşun 2'si Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine, diğer suşlar ise Çocuk Hastalıkları Servisine, Çocuk Yoğun Bakım Ünitesine, Göğüs Hastalıkları Servisine, Kalp-damar Cerrahisi Servisine, Dermatoloji Servisine, Üroloji servisine ve Üroloji Polikliniğine ait örneklerden izole edilmiştir. Suşların 5'i idrar, 2'si trakeal aspirat, 1'i yara ve 1'i balgam örneklerinden izole edilmiştir. Bu 9 *P. aeruginosa* suşunun 6'sı seftazidim dirençli olarak saptanmıştır. Suşların izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları Tablo-6'da gösterilmiştir.

PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda saptanmış olan 2 suş Çocuk Hastalıkları Servisine ve Göğüs Hastalıkları Servisine ait örneklerden izole edilmiştir. İdrar ve balgam örneklerine ait olan her iki suş da seftazidim dirençli olarak saptanmıştır (Tablo 7).

**Tablo 6.** OXA-10 pozitifliği saptanan 9 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servislere göre dağılımları

Suş No	Servis	Materyal	Seftazidim duyarlılığı
28	Çocuk Yoğun Bakım	İdrar	Dirençli
29	Üroloji poliklinik	İdrar	Duyarlı
33	Üroloji	İdrar	Dirençli
51	Dermatoloji	İdrar	Duyarlı
62	Çocuk Hastalıkları	İdrar	Dirençli
140	Kalp-damar Cerrahisi	Yara	Dirençli
157	Göğüs Hastalıkları	Balgam	Dirençli
55	Anestezi ve Yoğun Bakım	Trakea	Dirençli
121	Anestezi ve Yoğun Bakım	Trakea	Duyarlı

**Tablo 7.** PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda saptanmış olan 2 suşun izole edildikleri klinik örnekler ve gönderildikleri servisler

Suş No	Servis	Materyal	Seftazidim duyarlılığı
62	Çocuk Hastalıkları	İdrar	Dirençli
157	Göğüs Hastalıkları	Balgam	Dirençli

Çalışmaya alınan seftazidime dirençli yada duyarlı olan suşlarda PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz görülme oranı Tablo-8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Seftazidime dirençli ve duyarlı olan suşlarda PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz görülme oranı

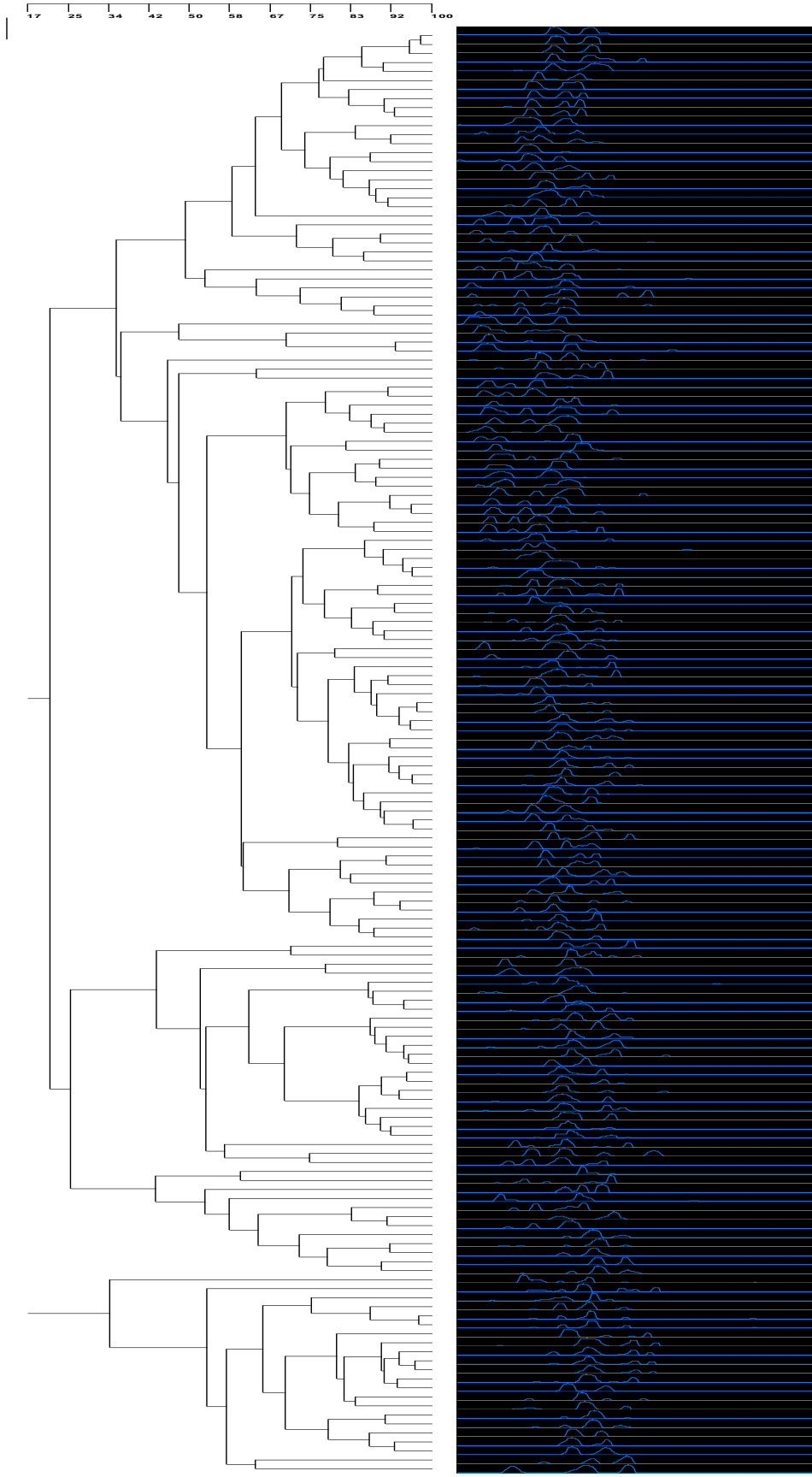
	OXA-10 pozitif (n:7)	PER-1 pozitif (n:4)	OXA-10 ve PER-1 pozitif (n:2)	Toplam	<i>p</i>
Seftazidim duyarlı (n:116)	3 (%2.5)	-	-	3 (%2.5)	0.0001
Seftazidim dirençli (n:44)	4 (%9.1)	4 (%9.1)	2 (%4.5)	10 (%22.7)	

Seftazidim dirençli suşlarda, PER-1 veya OXA-10 benzeri beta-laktamaz görülme oranı, seftazidim duyarlı suşlara göre daha yüksek saptandı ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0.0001$ , OR:11.0).

Çalışmaya dahil edilen suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD PCR çalışıldı. Suşlar arasındaki benzerlik oranları 'Syngene Gene Directory Application Version 2.01.02 (İngiltere)' kullanılarak değerlendirildi. İzole edilen tüm suşlar arasındaki RAPD analizine ait dendogram Şekil 4'te gösterilmiştir.

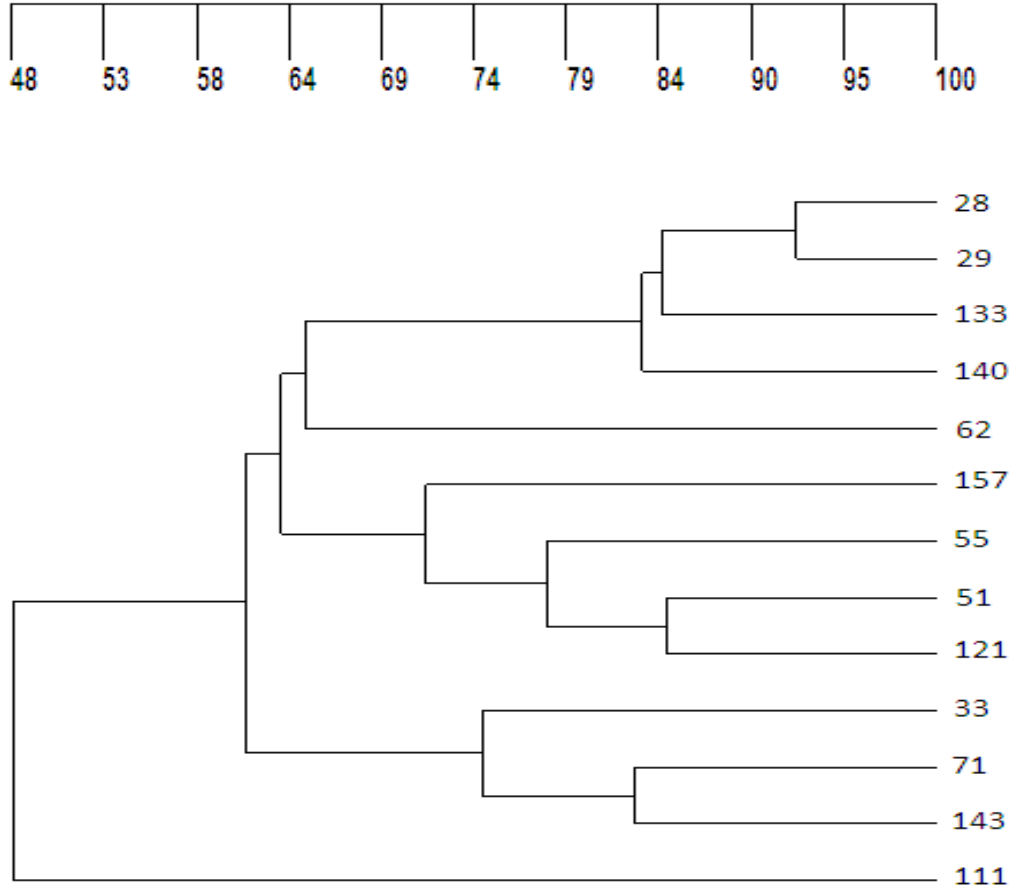
RAPD analizine göre çalışmaya alınan suşların farklı klonlara ait olduğu saptanmış, suşlar arasında herhangi bir klonal baskınlık izlenmemiştir.

PCR yöntemiyle PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 izolat arasında da herhangi bir klonal baskınlık izlenmemiştir. Bu izolatların RAPD analizine ait dendogramı Şekil 5'te, RAPD analizinin PCR görüntüsü ise Şekil 6'da gösterilmiştir.

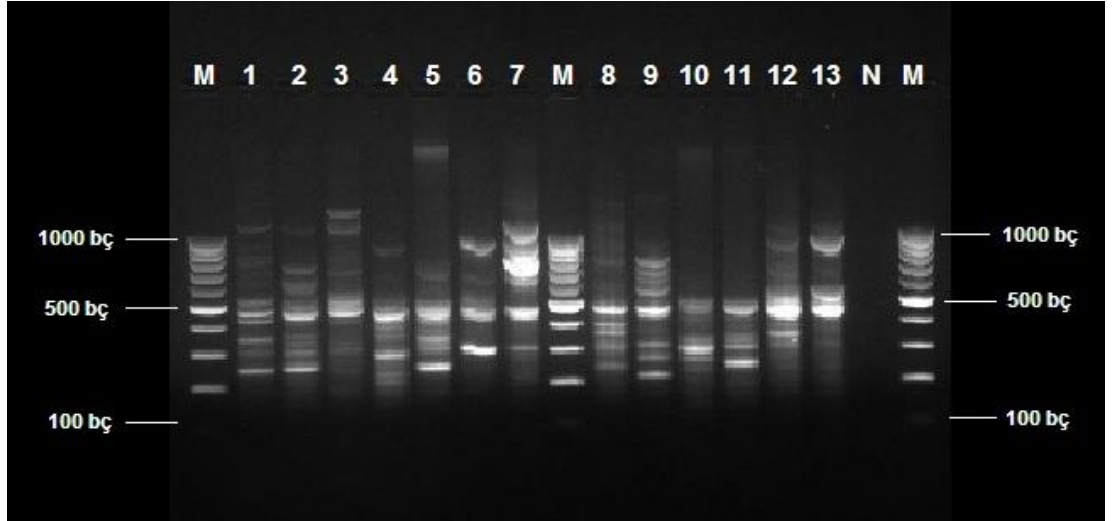


Şekil 4. İzole edilen tüm suşlar arasındaki RAPD analizine ait dendrogram





**Şekil 5.** PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 izolatın RAPD analizine ait dendogramı



**Şekil 6.** PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 izolatın RAPD analizinin PCR görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder, 1-7: *OXA-10* geni pozitif, 8-9: *PER-1* ve *OXA-10* geni pozitif suşlar, 10-13: *PER-1* geni pozitif suşlar, N: Negatif kontrol)

## TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tedavideki başarıyı olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür. *P. aeruginosa*, tüm dünyada hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır. Çevre koşullarına kolay adapte olabilen *P. aeruginosa*, sahip olduğu farklı virülans faktörleri ve antibiyotiklere hızla geliştirdiği direnç nedeniyle tedavisi zor, morbiditesi ve mortalitesi yüksek hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (68, 78).

Bizim araştırmamızda çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* suşları en sık Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine (%23.8) ait klinik örneklerden izole edilmiştir. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda da *P. aeruginosa* suşlarının gönderildikleri servisler incelendiğinde sıklıkla Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edildiği saptanmıştır (72, 80, 82, 118). Ancak bazı çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarının farklı kliniklerde daha sık saptandığı görülmüştür (69, 76).

*P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar, hastanelerin birçok farklı servislerinde görülebilmektedir. Ancak ülkemizdeki son yıllarda yapılan çalışmaları ve bizim çalışmamızı göz önüne aldığımızda özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastaların *P. aeruginosa* enfeksiyonları açısından önemli bir risk taşıdıklarını söyleyebiliriz. Bu hastaların antimikrobiyal profilaksisinde ve ampirik tedavisinde *P. aeruginosa*'nın da etken olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarına bakıldığında en yüksek dirence sahip olan antimikrobiyal ajanlar; sefotaksim (%95.6), aztreonam (%41.2) ve piperasilin (%40.0) olarak saptanmıştır. En düşük direnç oranları ise kolistinde (%1.2), amikasinde (%10.0), piperasilin/tazobaktamda (%11.9) ve siprofloksasinde (%11.9) görülmüştür.

*P. aeruginosa*'nın yaptığı enfeksiyonların tedavisinde, tedavi sırasında direnç gelişiminin önüne geçilmesi açısından kombinasyon tedavileri önerilmektedir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan antibiyotik grubu aminoglikozitlerdir (81). Amikasin, aminoglikozid modifiye edici enzimlerin etkisine en az duyarlı olan aminoglikozid olması nedeniyle bu grupta en fazla tercih edilen antimikrobiyal ajandır (68). Ülkemizde yapılan farklı araştırmalarda *P. aeruginosa*'nın amikasinine olan direnç

oranları oldukça geniş bir yelpazede yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda %1 ile %34 arasında değişen direnç oranları bildirilmiştir (68-70, 72, 74, 77, 80-82, 107, 118-120).

Yurtdışında yapılan araştırmalarda; Zhanel ve ark. (121) Kanada'da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada *P. aeruginosa*'ya en düşük direnci kolistinde (%0.8) ve amikasinde (%3.5) saptamışlardır. Landman ve ark. (122) Amerika'da yaptıkları çalışmada %4, Babay ve ark. (123) Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada %4, Malezya'da yapılan bir çalışmada (124) %9.2 ve Belçika'da (125) yapılan bir çalışmada %10.5 oranında amikasin direnci bildirilmiştir. Farklı zamanlarda, farklı bölgelerde ve farklı ülkelerde yapılan bu çalışmalarda direnç oranlarının değişiklik göstermesi antibiyotik kullanım politikalarındaki farklı uygulamalardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir (68).

Son yıllarda çoklu ilaç direnci olan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* enfeksiyonlarında kolistin tedavisi yeniden gündeme gelmiş ve tedavide kullanılmaya başlanmıştır (126). Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Özdemir ve ark. (72) %100, Öztürk ve ark. (127) %95.3, Türkdagi ve ark. (74) %100 Kolistin duyarlılığı saptamışlardır. Bizim çalışmamızda kolistin duyarlılığı, %98.8 olarak saptanmıştır ve bu da ülkemizdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Yurtdışında yapılan çalışmalarda Zhanel ve ark. (121) kolistine %0.8 direnç saptamışlardır. Bir diğer çalışmada Ateba ve ark. (128) %97.95 oranında kolistin duyarlılığı bildirmişlerdir. Direnç sorununun giderek arttığı günümüzde, eski antibiyotiklerden biri olan kolistin, her ne kadar nozokomiyal enfeksiyonlarda başarıyla kullanılsa da, yan etkileri ve direnç gelişme riski her zaman göz önünde tutulmalıdır (129).

Siprofloksasin *P. aeruginosa* dahil hastane kökenli gram negatif bakterilere etkili kinolonlardan birisidir ve tek başına yada diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılabilir (73). Asya-Pasifik, Avrupa, Latin Amerika ve Kuzey Amerika'dan elde edilen toplam 25.460 *P. aeruginosa* izolatı ile 1997-2007 yılları arasında yapılan SENTRY antimikrobiyal surveyans çalışmasında siprofloksasin duyarlılığı %71.5 olarak saptanmıştır (78). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde %14 ile %52 arasında değişen oranlarda siprofloksasin direnci

bildirilmiştir (69, 72-74, 76, 77, 79-82, 91, 104, 107, 118-120). Bizim çalışmamızda ise hastanemizdeki siprofloksasin direnci %11.9 olarak saptanmıştır. Bu oran ülke ortalamasının altındadır. Hastanemizde siprofloksasin direncinin düşük olması, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde siprofloksasinin az tercih ediliyor olabileceğini düşündürmektedir.

Karbapenemler, bakteriyel dirence karşı geliştirilmiş en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler olarak bilinmektedir. Günümüzde antipsödomonal antibiyotiklere karşı artan direnç, karbapenem kullanımını giderek artırmaktadır (76, 130). Ancak özellikle son dönemlerde *Pseudomonas* izolatlarında karbapenemaz üretimindeki artış, bu antibiyotiklere karşı direnci de beraberinde getirmektedir. Karbapenemlere direnç gelişmesinin en önemli nedeni olan karbapenemazlar, halen tedaviyi ciddi boyutlarda olumsuz etkilemese de, gelecek için sorun yaratabileceği endişesi göz ardı edilmemelidir (76).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem %3 ile %71, meropenem ise %9.5 ile %60 arasında değişen oranlarda direnç bildirilmiştir (68-74, 79-82, 104, 107, 118-120, 130).

Gür ve ark. (131) yaptıkları çok merkezli HİTİT sürveyans programının sonuçlarına göre imipenem direnci %28.9 olarak saptanmıştır. Jones ve ark. (78) yaptıkları SENTRY antimikrobiyal sürveyans programının sonuçlarına göre Avrupa'da imipenem direnci %22, meropenem direnci ise %18.5 olarak saptanmıştır. Belçika'da yapılan bir çalışmada (125) meropenem direnci %9.5 oranında tespit edilmiştir. Landman ve ark. (122) Amerika'da yaptıkları çalışmada ise imipenem direncini %31, meropenem direncini ise %23 olarak bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının %17.5'i imipenem dirençli, %82.5'i duyarlı olarak tespit edilmiştir. Suşların %15'i meropenem dirençli, %85'i duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda beta laktam grubu antimikrobiyal ajanlar içinde karbapenemler ve piperasilin/tazobaktam *P. aeruginosa* izolatlarına en etkili antibiyotikler olarak belirlenmiştir. Yurt içi ve yurt dışında yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar mevcuttur (69, 78, 79, 107, 118, 125).

Karbapenemlerin sık kullanımının, karbapenemaz üreten suşların seleksiyonuna yol açacağı unutulmamalıdır. Bu nedenle gerçekten endikasyon yoksa karbapenem kullanımından kaçınılması gerekmektedir. Antipsödomonal tedavi

seçiminde antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak tedavi yeniden düzenlenmelidir. Karbapenem grubu antimikrobiyal bir ajana direnç belirlendiğinde ise karbapenemaz varlığının fenotipik yöntemlerle taranıp, moleküler yöntemlerle de doğrulanmasının, enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik yönden önemli olduğu düşünülmektedir (130).

Piperasilin/tazobaktam, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yüksek duyarlılık oranı nedeniyle sık tercih edilen bir antimikrobiyal ajandır (132). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* izolatlarında piperasilin/tazobaktama %7.8 ile %97 arasında değişen direnç oranları bildirilmiştir (68, 70-74, 76, 79-82, 107, 119, 120, 132).

Gür ve ark. (131) yaptıkları çok merkezli HİTİT sürveyans programının sonuçlarına göre Piperasilin/tazobaktam direncini %22.7 olarak saptamışlardır. Ayrıca beta-laktam grubu antibiyotikler arasında piperasilin/tazobaktamın *P. aeruginosa*'ya karşı en az direnç oranına sahip olan antimikrobiyal ajan olduğunu bildirmişlerdir. Jones ve ark. (78) 1997-2007 yılları arasında Asya-Pasifik, Avrupa, Latin Amerika ve Kuzey Amerika'dan elde edilen toplam 25.460 *P. aeruginosa* izolatu ile yaptıkları SENTRY antimikrobiyal sürveyans çalışmasında piperasilin/tazobaktam duyarlılığı %83.6 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca piperasilin/tazobaktamın en etkili antipsödomonal ajan olduğu da bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının %11.9'u piperasilin/tazobaktama dirençli olarak saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda piperasilin/tazobaktam, karbapenemlerle beraber, beta laktam grubu antimikrobiyal ajanlar içinde en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır. Bu sonuç Gür ve ark. (131) yaptıkları HİTİT sürveyans programının sonuçları ve Jones ve ark. (78) yaptıkları SENTRY antimikrobiyal sürveyans programının sonuçları ile uyumludur.

Seftazidim, beta-laktamazlara karşı yüksek derecede dirençli olan antipsödomonal bir üçüncü kuşak sefalosporindir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların kombine tedavisinde öncelikle tercih edilen antimikrobiyal ajanlardan birisi olan seftazidim, ampirik tedavilerde de kullanılmaktadır (133). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda %11 ile %71.1 arasında değişen oranlarda *P. aeruginosa* suşlarında seftazidime karşı direnç saptanmıştır. (68-74, 76, 79-82, 104,

107, 108, 115, 118-120). Gür ve ark. (131) yaptıkları çok merkezli HİTİT sörveyans programının sonuçlarına göre seftazidim direnci %25.3 olarak bildirilmiştir.

Yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda; Strateva ve ark. (134) Bulgaristan'da yürüttükleri çok merkezli bir çalışmada %45.8 oranında seftazidim direnci saptamışlardır. Van Eldere J'nin (125) Belçika'da yaptığı çalışmada %28.5, Babay HA'nın (123) Suudi Arabistan'da yaptığı çalışmada %14, Ateba ve ark. (128) %57.4, Malezya'da yapılan bir çalışmada (124) %19.6, Endimiani ve ark. (135) İtalya'da yaptıkları çalışmada seftazidim direnci %21.3 olarak saptanmıştır. Landman ve ark. (122) Amerika'da yaptıkları çalışmada %18 oranında seftazidim direnci bildirilmiştir. Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sörveyans Sistemi (EARSS)'nin 33 ülkeden topladıkları veriler sonucunda seftazidim direnci bu ülkelerde %4 ile %44.8 arasında değişmektedir (136). Aynı çalışmada ülkemizdeki seftazidim direnci %31.3 olarak bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının %27.5'i seftazidim dirençli olarak saptanmıştır. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda ve ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda seftazidim direnç oranları oldukça geniş bir yelpazede yer almaktadır. Bunun sebebi antibiyotik kullanım politikalarındaki farklılıklar, dirençli bir suşun klonal baskınlığı olabilir. Üçüncü kuşak sefalosporinlerin, enfeksiyonların ampirik tedavisinde yaygın olarak kullanılması; gerek dereprese mutantların seleksiyonuna gerekse GSBL sentezleyen bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durum ise *P. aeruginosa* suşlarında ilaç direncine, tedavide başarısızlığa ve mortalite oranlarında artışa yol açmaktadır (133).

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunmakla birlikte, 1980'li yıllardan bu yana *P. aeruginosa* suşlarında da bildirilmekte ve giderek yaygınlaşmaktadır. Bu tür enzimler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize ederler. *P. aeruginosa*'da günümüze kadar birçok GSBL bildirilmiştir (107). Genetik çeşitliliği oldukça fazla olan GSBL enzimlerinin moleküler yöntemlerle saptanması, zaman alan ve maliyeti yüksek uygulamalar oldukları için klinik mikrobiyoloji laboratvarlarında rutin olarak kullanılmamaktadır (115). Çift disk sinerji testi GSBL üretiminin belirlenmesinde, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay fenotipik bir yöntemdir. İnhibisyon zon çapının ölçülmesine

gerek olmayan, sadece sinerjinin varlığının ve yokluğunun görülmesi ile değerlendirilen bir testtir (110).

Bizim çalışmamızda, 160 *P. aeruginosa* suşunda, fenotipik olarak GSBL varlığını araştırmak için yapılan çift disk sinerji testinde pozitiflik saptanmamıştır. Bert ve ark. (137) *P. aeruginosa* izolatlarında, amoksisilin-klavulanik asit diski ile etrafına yerleştirilen diğer diskler arasındaki mesafe yaklaştırıldığında çift disk sinerji testinin duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda çift disk sinerji testi, amoksisilin-klavulanik asit diski ile indikatör antibiyotikleri içeren diğer diskler arasındaki mesafe 18 ve 13 mm olacak şekilde (115) iki kez tekrar uygulandığında da çalışmaya alınan suşlarda pozitiflik saptanmamıştır.

Sefepim, AmpC sefalosporinaz enziminden daha az etkilenen dördüncü kuşak sefalosporindir. GSBL ile birlikte AmpC beta-laktamaz taşıyan suşlarda GSBL'nin saptanmasında alternatif sefalosporin olarak sefepim kullanılması önerilmektedir (110). Yaptığımız çalışmada çift disk sinerji testine indikatör antibiyotik olarak sefepim de eklenmiştir. Ancak sefepim, moleküler yöntemlerle PER-1 ve OXA-10 tipi GSBL taşıdığı bilinen 13 *P. aeruginosa* suşunda, fenotipik olarak bu enzimlerin varlığını saptayamamıştır.

Aktaş ve ark. (107) da yaptıkları çalışmada çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitifliğini %7 saptamışlar ve çift disk sinerji testinin PER-1 ve OXA-10 tipi beta-laktamazları saptamada yetersiz kaldığı sonucuna varmışlardır. Aktaş ve ark. (9) yaptıkları başka bir çalışmada yoğun bakım hastalarından izole edilen seftazidime dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında çift disk sinerji testi ile GSBL pozitifliğini %37 olarak saptamışlardır.

Söğüt ve ark. (108) yaptıkları çalışmada moleküler yöntemlerle PER-1 ve OXA-10 tipi GSBL taşıdığı saptanmış 50 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatında, çift disk sinerji yöntemi ile 32 izolatta (%64) pozitiflik görülmüş ve *P. aeruginosa* suşlarında çift disk sinerji testinin GSBL'yi saptamada yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır.

Öztürk ve ark. (76) yaptıkları bir çalışmada çift disk sinerji yöntemiyle 97 *P. aeruginosa* izolatının 5'inde GSBL'nin varlığını gösterebilmişlerdir. Dede BY'nin (138) yaptığı çalışmada çift disk sinerji yöntemi ile %5 oranında GSBL saptanmıştır.

Yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda; Okesola ve ark. (139) %22.2, Begum ve ark. (140) %39.2 oranında pozitiflik bildirmişlerdir. İtalya’da yapılan bir çalışmada Endimiani ve ark. (135) seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında çift disk sinerji yöntemi ile %34.6 oranında GSBL pozitifliği saptamışlardır.

Zarakolu ve ark. (115) yaptıkları çalışmada çift disk sinerji yönteminde diskler arası mesafe 18 mm olacak şekilde test uygulandığında GSBL pozitiflik oranı %13.1, mesafe 13 mm olduğunda ise %31.5 oranında GSBL pozitifliği saptamışlardır. İzolatlardan 18 mm’de pozitif bulunanların hepsi 13 mm’de de pozitif saptanırken, 7 izolatin sadece 13 mm’de pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Diskler arasındaki mesafenin azaltılması pozitiflik oranını artırsada çift disk sinerji testinin düşük maliyetine rağmen *P. aeruginosa* suşlarında GSBL’yi saptamada yetersiz kaldığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak bizim yaptığımız çalışmaya ve yapılan diğer çalışmalara göre; *P. aeruginosa* suşlarında çift disk sinerji testi, PER-1 ve OXA-10 tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların varlığını saptamada yetersiz kalmaktadır.

GSBL’nin varlığını saptamaya yönelik bir diğer fenotipik yöntem olan E-test yöntemi çalışmaya alınan 160 suşa uygulandı. Sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit içeren E-test stripleri kullanılarak test uygulandı. E-test yöntemi, moleküler yöntemlerle PER-1 ve OXA-10 tipi GSBL taşıdığı saptanmış olan 13 *P. aeruginosa* suşu dahil tüm suşlarda negatif sonuç verdi. Zarakolu ve ark. (115) yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarının %78.9’u, Seftazidim/seftazdim+klavulanik asit içeren E-test stripleri ile, %21.1’i ise Sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit içeren E-test stripleri ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarında GSBL’nin varlığını saptamada farklı fenotipik yöntemler karşılaştırılmış fakat çıkan sonuçlar moleküler yöntemlerle değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak GSBL ürettiği bilinen *P. aeruginosa* suşlarında, GSBL varlığının saptanması amacıyla standart bir yöntem henüz tanımlanamamıştır (115). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılacak, maliyeti düşük, zaman alıcı olmayan, uygulanması ve yorumlanması kolay fenotipik bir yöntemin tanımlanabilmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

*P. aeruginosa* suşlarında PER-1 enziminin varlığı ilk defa 1991 yılında Fransa’da bir hastanede Türk hastanın idrar kültüründen izole edilerek saptanmıştır.



Tipik bir GSBL enziminin substrat profiline sahip olan PER-1, beta-laktamaz inhibitörleri ve imipenem ile inhibe olmaktadır. Başta Türkiye olmak üzere Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda, *P. aeruginosa* suşlarında varlığı saptanmıştır. (11 12).

Vahaboğlu ve ark. (13) 1997 yılında Türkiye'nin yedi ayrı bölgesinde yer alan 8 farklı üniversite hastanesinden üç aylık bir periyotta izole edilen toplam 367 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada %11 oranında PER-1 pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada ayrıca tüm suşların %28'nin seftazidim dirençli olduğu ve seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında PER-1 pozitifliğinin %38 oranında olduğu bildirilmiştir.

Aktaş ve ark. (9) İstanbul'da Şubat 1999- Şubat 2000 tarihleri arasında 287 *P. aeruginosa* klinik izolatları ile yaptıkları çalışmada %39 oranında seftazidim direnci bildirmişlerdir. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen suşlardaki seftazidim direncini ise %62 olarak saptamışlardır. Ayrıca PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitesinden izole edilen 49 çoğul dirençli izolatın 42'sinde (%86) PER-1 pozitifliği saptamışlardır. Aktaş ve ark. (107) yaptıkları başka bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *P.aeruginosa* suşunda PCR yöntemiyle %11 oranında PER-1 pozitifliği saptamışlardır.

Kolaylı ve ark. (8) Nisan-Haziran 2003 tarihleri arasında üç aylık bir periyod içerisinde Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan yedi farklı üniversite hastanesinden izole edilen toplam 92 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle %55.4 oranında PER-1 pozitifliği olduğunu bildirmişlerdir.

Zarakolu ve ark. (141) Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hastalara ait farklı klinik örneklerden hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 67 *P.aeruginosa* suşu ile PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada; izolatların %22.7'si (15/67) PER-1 varlığı yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca PER-1 pozitif izolatların %20'si (3/15) seftazidime karşı duyarlı bulunmuştur.

Çelik N'nin (142) 50 hastadan izole edilmiş olan seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında PCR ile yaptığı çalışmada; 22 (%44) suşta PER-1 pozitifliği saptanmıştır.

Atilla ve ark. (104) Mayıs 2002- Haziran 2003 tarihleri arasında hastane enfeksiyonu etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilen 110 *P. aeruginosa*

suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle %56.4 oranında PER-1 pozitifliği saptamışlardır. Seftazidim dirençli suşlarda PER-1 pozitifliği ise %78.5 olarak bildirilmiştir. Aynı hastanede Söğüt ve ark. (108) Ocak 2007- Ocak 2008 tarihleri arasında 50 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle %46 oranında PER-1 pozitifliği saptamışlardır.

Mirsalehian ve ark. (117) İran'da Mart 2007- Temmuz 2007 tarihleri arasında yanık ünitesinden izole edilen 170 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle 33 izolatta PER-1 pozitifliği saptamışlardır.

Yong ve ark. (144) Güney Kore'de, 2001- 2002 yılları arasında, üçüncü basamak sağlık hizmeti veren iki ayrı hastaneden izole ettikleri 97 *Acinetobacter spp.* suşunda %54.6 oranında PER-1 pozitifliği saptamışlardır. Ancak seftazidime dirençli 181 *P. aeruginosa* izolatında ise PER-1 pozitifliğine rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Claeys ve ark. (145) Belçika'da, yedi aylık bir periyod içerisinde, yoğun bakım ünitesinde aynı odada kalan 13 hastadan izole edilen seftazidime dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının 10 tanesinde, PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada, PER-1 pozitifliği saptamışlardır.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 160 *P. aeruginosa* suşu ile yaptığımız bu çalışmada, PCR yöntemi kullanılarak toplam altı suşta (%3.75) PER-1 pozitifliği saptanmıştır.

İtalya'da bir hastanenin yoğun bakım ünitesinde PER-1 enzimi üreten *P. aeruginosa* suşunun neden olduğu bir hastane salgını meydana gelmiştir. Epidemik izolatın, aminoglikozidlere ve florokinolonlara yüksek direnç gösterdiği, imipenem ve meropeneme duyarlı olduğu bildirilmiştir (14). PER-1 enzimi üreten *P. aeruginosa* suşunun neden olduğu bir diğer hastane salgını ise Polonya'da bir hastaneden bildirilmiştir (106).

Çalışmamızda ayrıca seftazidim dirençli suşlarda PER-1 pozitifliği %13.6 oranında tespit edilmiştir. *P. aeruginosa*, aktif pompa sistemlerinin uyarılması ve yüksek düzey ekspresyonu, dış membran geçirgenliğinin azalması, hedef yapısında değişiklik olması, ilacı inaktive eden enzimlerin üretimi gibi birçok farklı mekanizmalarla antimikrobiyal ajanlara direnç kazanabilmektedir (83, 117).

Çalışmamızda saptadığımız seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının muhtemelen farklı direnç mekanizmaları ile direnç geliştirdikleri düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda, PER-1 pozitifliği saptanan suşların tamamının seftazidime dirençli olduğu görülmüştür. Tipik bir GSBL enziminin substrat profiline sahip olan PER-1, dar spektrumlu penisilinlere, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı yüksek affinite gösterir. Karbapenemlere karşı düşük afinitesi olan PER-1 enzimi, klavulonik asit ve imipenemle kolayca inhibe olmaktadır (143).

Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasında grup 2d (moleküler sınıf D)'de yer alan OXA-10, birçok OXA tipi GSBL'ler ile yapısal ilişkisi olması nedeniyle bu grubun önemli bir üyesidir. OXA-10 benzeri GSBL'ler arasında OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-13 ve OXA-13 türevleri olan OXA-19 ve OXA-28 sayılabilir. (11, 94). Bu tip beta-laktamazlar, *Enterobacteriaceae* ailesi dahil birçok gram negatif bakteri tarafından üretilmekle beraber daha çok *P. aeruginosa* suşlarında saptanmaktadır (100, 107).

Vahaboğlu ve ark. (146) Türkiyenin farklı bölgelerinde yer alan üç farklı üniversite hastanesinden üç aylık bir periyotta izole edilen toplam 76 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada %5.3 oranında OXA-10 benzeri beta-laktamaz pozitifliği saptamışlardır. Ayrıca suşların %10.5'inde PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamazların beraber saptandığı bildirilmiştir.

Çelik N'nin (142) yaptığı çalışmada, 50 hastadan izole edilmiş olan seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında, PCR yöntemi kullanarak 23 (%46) suşta OXA-10 pozitifliği saptanmıştır.

Söğüt ve ark. (108) Ocak 2007- Ocak 2008 tarihleri arasında izole ettikleri 50 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşu ile PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada %78 oranında OXA-10 benzeri beta-laktamaz pozitifliği saptamışlardır. Ayrıca suşların %23'ünde PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamazların beraber saptandığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda seftazidim dirençli 44 suşun 10'unda (%22.5) PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmıştır.

Aktaş ve ark. (9) İstanbul'da Şubat 1999- Şubat 2000 tarihleri arasında 287 *P. aeruginosa* klinik izolatları ile PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitesinden izole edilen 49 çoğul dirençli izolatın 27'sinde (%54) OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığını pozitif olarak saptamışlardır. Ayrıca 20 suşta (%41) PER-1

ve OXA-10 benzeri beta laktamazların beraber saptandığı bildirilmiştir. Aktaş ve ark. (107) yaptıkları başka bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *P.aeruginosa* suşunda PCR yöntemiyle %11 oranında OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca suşların %4'ünde PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamazların beraber saptandığı bildirilmiştir. Bu çalışmadaki dikkat çekici nokta, OXA-10 benzeri beta-laktamaz pozitifliği saptanan 11 suştan altısının seftazidime duyarlı olmasıdır. Seftazidim duyarlılığının disk difüzyon ve E-test yöntemiyle tekrarlandığında da sonuçların aynı bulunduğu bildirilmiştir.

Lee ve ark. (147) Güney Kore'de Nisan 2002 ve Haziran 2002 tarihleri arasında 252 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çok merkezli bir çalışmada PCR yöntemiyle %13.1 oranında OXA-10 pozitifliği bildirmişlerdir. Mirsalehian ve ark. (117) İranda Mart 2007- Temmuz 2007 tarihleri arasında yanık ünitesinden izole edilen 170 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle 50 izolatta OXA-10 pozitifliği saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda ondört ay boyunca toplanan 160 *P. aeruginosa* klinik izolatta OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği %5.6 olarak saptanmıştır. Toplam iki suşta ise PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamazlar aynı anda tespit edilmiştir. Ayrıca seftazidime dirençli olan suşlarda OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği %13.6 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda dikkat çekici bir nokta ise OXA-10 benzeri beta-laktamaz pozitifliği saptanan 9 suşun üçünün seftazidime duyarlı olmasıdır. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde Aktaş ve ark. (107) da seftazidim duyarlı suşlarda OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda seftazidime duyarlı suşlar arasında %2.5 oranında OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmıştır. Sonuç olarak mikrobiyoloji laboratuvarlarına rutin olarak gelen klinik örneklerden izole edilen seftazidim duyarlı *P. aeruginosa* suşlarında da OXA-10 benzeri GSBL pozitifliğinin olabileceği unutulmamalıdır.

VEB-1 tip beta-laktamaz enzimi *P. aeruginosa*'da ilk defa 1998 yılında Fransa'da saptanmıştır. Özellikle seftazidime, sefotaksime ve aztreonama karşı yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır. Bununla beraber klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine oldukça duyarlıdır. Birçok farklı ülkeden VEB-1 üreten suşlar rapor edilmiştir. *P. aeruginosa* dışında *Enterobacteriaceae* ve *A. baumannii* suşlarında da varlığı saptanmış olan VEB-1

tip beta-laktamazın seftazidim dirençli nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara neden olması, bu enzimi önemli hale getirmiştir (11, 101). Fransa'da bir hastanede VEB-1 tip beta-laktamaz salgılayan *A. baumannii* suşlarının neden olduğu bir hastane salgını, iki hafta süreyle salgının meydana geldiği yoğun bakım ünitesi kapatılarak kontrol altına alınabilmiştir (109).

Woodford ve ark. (148) İngiltere'de Kasım 2003- Kasım 2007 tarihleri arasında onüç farklı merkezden izole ettikleri *P. aeruginosa* suşları ile PCR yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada toplam 32 izolatta VEB-1 tip GSBL varlığını göstermişlerdir.

Mirsalehian ve ark. (117) İran'da Mart 2007- Temmuz 2007 tarihleri arasında yanık ünitesinden izole edilen 170 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR yöntemiyle 21 izolatta VEB-1 tip beta-laktamaz pozitifliği saptamışlardır.

Strateva ve ark. (149) Bulgaristan'da 2001-2005 yılları arasında beş ayrı üniversite hastanesinden topladıkları 132 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşu ile PCR yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada %56.8 oranında VEB-1 tip beta-laktamaz pozitifliği saptamışlardır. VEB-1 tip beta-laktamazın Sofya'dan izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşları arasında önemli bir varlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada hastanemizden izole edilen *P. aeruginosa* suşları arasında VEB-1 tip beta-laktamazın varlığına rastlanmamıştır. Ülkemizdeki diğer merkezlerde de VEB-1 tip beta-laktamaz üreten suşların varlığına dair bir yayın bulunmamaktadır. Ancak bu enzimin ülkemize komşu bölgelerde *P. aeruginosa* klinik izolatlarında saptanmış olması bizde de görülme riski taşımaktadır. Bu nedenden dolayı başta *P.aeruginosa* olmak üzere *Enterobacteriaceae* ve *A. baumannii* suşlarının ve özellikle seftazidim dirençli izolatların neden olduğu hastane enfeksiyonlarında ve salgınlarında bu enzimin de etken olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

PER-1 ve OXA-10 benzeri GSBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının klonal yakınlıklarını ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek; ileride bu enzimleri üreten suşlarla oluşabilecek hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde oldukça önemlidir. Moleküler tiplendirme yapılarak izolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması ile salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkında

hipotezler oluşturulabilmekte ve bu sayede enfeksiyon kontrol stratejilerinin etkinliği artırılabilir. Her hastanenin nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara neden olabilecek bakterilerin direnç paternlerinin ve klonal ilişkilerinin yer aldığı bir veri bankası oluşturması bu açıdan önemlidir (150).

Aktaş ve ark. (9) saptadıkları 42 PER-1 pozitif *P. aeruginosa* izolatının, RAPD-PCR yöntemiyle, klonal ilişkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 16 farklı band paterni saptamışlardır. Ancak bu suşlardan 25'inin (%60) iki farklı paterne ait olduğunu, PER-1 ve OXA-10 benzer beta-laktamazların her ikisini de üreten 20 izolatın 10'unun ise tek bir paterne ait olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak hastalar arasında, klonal olarak ilişkili suşların yayılım gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kolaylı ve ark. (8) üç aylık bir periyod içerisinde Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan yedi farklı üniversite hastanesinde saptadıkları PER-1 pozitif *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarının klonal yakınlığını araştırmak için RAPD-PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada PER-1'in multiklonal bir yayılım gösterdiğini bildirmişlerdir.

Eraç B'nin (151) yaptığı bir çalışmada seftazidim dirençli *P.aeruginosa* suşlarında %46.2 oranında PER-1 pozitifliği saptanmıştır. PER-1 tip GSBL üreten bu suşlar arasında klonal ilişkinin saptanması amacıyla yapılan ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) sonuçlarına göre; *P.aeruginosa* izolatları arasında belirlenen iki ana klonun, saptanan yüksek prevalanstan sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Eraç ve ark. (152) PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada 73 seftazidim dirençli *P.aeruginosa* suşunun 17'sinde (%23.3) PER-1 pozitifliği saptamışlardır. PER-1 tip GSBL üreten bu suşların klonal yakınlığının belirlenmesi amacıyla ERIC-PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada bu suşların çoğunluğunun klonal olarak ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Söğüt'ün (153) çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının klonal ilişkilerini saptamak amacıyla RAPD-PCR yöntemi kullanarak yaptığı bir çalışmada toplam 11 adet farklı band paterni saptanmıştır. Suşların %52'sinin iki farklı paterne ait olduğu ve bu suşların izole edildikleri servisler açısından epidemiyolojik olarak da ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada PER-1 ve

OXA-10 beta-laktamaz prevalansının yüksek olmasının büyük ölçüde klonal olarak ilişkili suşların hastalar arasındaki geçişinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda PCR yöntemiyle PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptanmış 13 *P. aeruginosa* izolatına RAPD analizi yapılmıştır. Suşlar arasında herhangi bir klonal baskınlık izlenmemiştir. Hastanemizde *P. aeruginosa* suşlarında, PER-1 ve OXA-10 benzeri beta-laktamazların görülme sıklığının ülkemizde yapılan diğer çalışmalara göre daha düşük olmasının bir nedeni olarak *P. aeruginosa* suşlarında, antimikrobiyal ajanlara dirençli bir klon hakimiyetinin olmaması ve bu suşların farklı klonlara ait olması söylenilebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada Ocak 2011 ve Şubat 2012 tarihleri arasında izole edilen 160 *P. aeruginosa* suşunda genotipik olarak PER-1, OXA-10 benzeri ve VEB-1 tip genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının 6'sında (% 3.75) PER-1, 9'unda (% 5.6) OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı saptanmıştır. Toplam 2 suşta (% 1.2) ise PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda izlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ve farklı zamanlarda, farklı bölgelerde ve farklı hastanelerde yapılan çalışmalarda, bu oranların değişiklik göstermesinde; hastaneler arasında antibiyotik kullanım politikalarındaki farklı uygulamalar, enfeksiyon kontrol komitesinin farklı yaklaşımları, sterilizasyon ve dezenfeksiyon konusunda farklı yaklaşımlar, *P. aeruginosa*'nın çevresel faktörlere ve dezenfektanlara karşı kolayca direnç geliştirebilmesi ve buna bağlı olarak servis içinde yada servisler arasında dirençli klonun kolayca yayılabilmesi gibi nedenlerin etkili olabileceği düşünülmektedir.

PER-1 ve OXA-10 benzeri GSBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının klonal yakınlıklarını ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek; ileride bu enzimleri üreten suşlarla oluşabilecek hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde oldukça önemlidir. Moleküler tiplendirme yapılarak izolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması ile salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkında hipotezler oluşturulabilmekte ve bu sayede enfeksiyon kontrol stratejilerinin etkinliği artırılabilir. Her hastanenin nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara neden olabilecek bakterilerin direnç paternlerinin ve klonal ilişkilerinin yer aldığı bir veri bankası oluşturması bu açıdan önemlidir (150).

*P. aeruginosa*'nın etken olduğu hastalıklar yüzeyel deri enfeksiyonundan fulminan sepsise kadar geniş bir grupta yer almaktadır. Birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç göstermesi nedeniyle etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu bakteriler karbapenemler dahil birçok antibiyotiğe karşı hızla çoğul direnç geliştirebilmektedirler. Antibiyotik direnci hastaneden hastaneye hatta servisten servise değişiklikler gösterebilmesi nedeni ile, özellikle ampirik tedavi gereken durumlarda klinisyenlere yol gösterebilmesi amacıyla, her hastanede bu tür dirençli bakterilerin sürveyansının belirlenmesi gereklidir (73, 80). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında erken ve doğru antibiyotiklerle tedaviye başlanması oldukça önemlidir. Akılcı antibiyotik kullanımı ile etkin tedavinin sağlanması, antibiyotik direncinde azalma yanında mortalite ve morbiditenin azalmasına da neden olacaktır.



## SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Toplam 160 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya alındı. Suşların %35.6'sı idrar, %26.3'ü yara, %13.1'i trakeal aspirat, %13.1'i balgam, %9.4'ü kan, %2.5'i bronko-alveolar lavaj örneklerinden izole edildi.

2- Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* suşları en sık Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine (%23.8) ait örneklerden izole edildi. Ayrıca sıklık sırasına göre suşların %10'u Pediatri Bölümüne, %8.1'i Göğüs Hastalıkları Servisine, %8.1'i Kalp-damar Cerrahisi Servisine, %5.6'sı Üroloji Servisine, %5.6'sı Dermatoloji Servisine, %5.6'sı Plastik Cerrahi Servisine ve %33.2'si diğer servislere ait klinik örneklerden izole edildi.

3- Suşların antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde; en yüksek direnç oranları sırasıyla sefotaksimde %95.6, aztreonamda %41.2 ve piperasilinde %40 olarak görüldü. Ayrıca en duyarlı antimikrobiyal ajan kolistin (%98.8) olarak saptandı. İkinci en yüksek duyarlılık oranı ise amikaside (%90.0) izlendi. Ayrıca beta-laktam grubu antibiyotikler arasında *P. aeruginosa*'ya karşı en duyarlı antimikrobiyal ajanın piperasilin/tazobaktam (%88.1) olduğu saptandı.

4- Çalışmaya alınan 160 *P. aeruginosa* suşunda, fenotipik olarak GSBL varlığını araştırmak için yapılan çift disk sinerji testinde pozitiflik saptanmadı. Aynı test AMC diski ile etrafına yerleştirilen diğer diskler arasındaki mesafe 18 ve 13 mm olacak şekilde iki kez tekrar uygulandığında da çalışmaya alınan suşlarda pozitiflik saptanmadı.

5- GSBL'nin varlığını saptamaya yönelik bir diğer fenotipik yöntem olan E-test yöntemi çalışmaya alınan 160 suşa uygulandı. GSBL negatif olarak saptandı.

6- İzole edilen 160 *P. aeruginosa* suşunda genotipik olarak PER-1, OXA-10 benzeri ve VEB-1 tip beta-laktamaz varlığı PCR yöntemiyle araştırıldı. Suşların % 3.75'inde PER-1, % 5.6'sında OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği saptandı. Toplam 2 suşta (% 1.25) ise PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda izlendi. Seftazidim dirençli suşlar arasında PER-1 ve/veya OXA-10 benzeri beta laktamaz pozitifliği %22.5 olarak bulundu. PCR yöntemiyle suşların hiçbirinde VEB-1 geni saptanmadı.

7- PER-1 pozitifliği saptanan 6 suşun 2'si Çocuk Hastalıkları Servisine, 2'si Göğüs Hastalıkları Servisine, 1'i Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine ve diğer 1 suş ise Genel Cerrahi Servisine ait örneklerden izole edildi. Suşların 2'si yara diğerleri ise balgam, idrar, bronko-alveolar lavaj ve trakeal aspirat örneklerinden izole edildi. Bu suşların hepsi seftazidime dirençli olarak saptandı.

8- OXA-10 pozitifliği saptanan 9 suşun 2'si Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesine, diğer suşlar ise Çocuk Yoğun Bakım Ünitesine, Üroloji Polikliniğine, Çocuk Hastalıkları, Göğüs Hastalıkları, Kalp-damar Cerrahisi, Dermatoloji ve Üroloji Servisine ait örneklerden izole edildi. Suşların 5'i idrar, 2'si trakeal aspirat, 1'i yara ve 1'i balgam örneklerinden izole edildi. Bu 9 *P. aeruginosa* suşunun 6'sı seftazidim dirençli olarak saptandı.

9- PER-1 ve OXA-10 benzeri beta laktamaz varlığı aynı anda saptanmış olan 2 suş Çocuk Hastalıkları Servisine ve Göğüs Hastalıkları Servisine ait örneklerden izole edildi. İdrar ve balgam örneklerine ait olan her iki suş da seftazidim dirençli olarak saptandı.

10- RAPD analizine göre çalışmaya alınan suşların farklı klonlara ait olduğu saptandı. Suşlar arasında herhangi bir klonal baskınlık izlenmedi.

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarında erken ve doğru antibiyotiklerle tedaviye başlamak oldukça önemlidir. Antibiyotik direncinin hastaneden hastaneye hatta servisten servise değişiklikler gösterebilmesi nedeni ile her hastanede bu tür dirençli bakterilerin sürveyansı gereklidir. PER-1 ve OXA-10 benzeri GSBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarının klonal yakınlıklarını ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek; ileride bu enzimleri üreten suşlarla oluşabilecek hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde oldukça önemlidir. Enfeksiyon kontrol stratejileri oluşturmak için her hastanenin nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara neden olabilecek bakterilerin direnç paternlerinin ve klonal ilişkilerinin yer aldığı bir veri bankası oluşturması önemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Yalçın AN. Nozokomiyal gram negatif çomak enfeksiyonları. *Klimik Derg* 2000;13(özel sayı):23-5.
2. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(4):17-32.
3. Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. (Çev. Şener B.) *Pseudomonas*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. eds. (Başustaoğlu A. Çev Ed.), Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009:734-43.
4. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone 2000:2835-57.
5. Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg* 2005;19(2):68-70.
6. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klimik Derg* 2001;14(2):41-6.
7. Gür D. Genişlemiş Spektrumlu (ESBL) ve Plazmid Kaynaklı AmpC Beta-Laktamazlar. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 16-20 Kasım 2005; Belek, Antalya. *Klimik Derg* 2005;18(özel sayı 1):147-51.

8. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboğlu H, et al. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol Lett 2005;249:241-5.
9. Aktaş Z, Poirel L, Şalcıoğlu M, Özcan PE, Midilli K, Bal Ç ve ark. PER-1 and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. Clin Microbiol Infect 2005;11(3):193-8.
10. Juan C, Mulet X, Zamorano L, Albertí S, Pérez L, Oliver A. Detection of the novel extended-spectrum beta-lactamase OXA-161 from a plasmid-located Integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(12):5288-90.
11. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009;58:1133-48.
12. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Briand YM, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37(5):962-9.
13. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A ve ark. Widespread detection of PER-1-Type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey:a Nationwide Multicenter Study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(10):2265-9.
14. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol 2001;39(5):1865-70.

15. Gönüllü N, Gürol Y, Bülüç M, Bal Ç. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülen beta-laktam direnç fenotipleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Hastane İnfeksi Derg* 2003;7:141-7.
16. Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. *Hastane İnfeksi Derg* 2000;4:92-6.
17. Bilgehan H. Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. baskı, İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları 2000:175-88.
18. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: Washington C, Winn JR, eds. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2006:303-91.
19. Moore ERB, Tindall BJ, Santos VAP, Pieper DH, Ramos JL, Palleroni NJ. Nonmedical: *Pseudomonas*. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The Prokaryotes. Springer 2006;6:646-703.
20. Erdem B. *Pseudomonaslar*, Ustaçelebi Ş. ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999:551-8.
21. Thomas AJS, Syhre M, Pattemore PK, Epton M, Laing R, Pearson J, Chambers ST. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 2010;10(56):1-10.
22. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infect Immun* 1998;66(1):43-51.

23. Cobb LM, Mychaleckyj JC, Wozniak DJ, Boado YSL. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: Implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol* 2004;173:5659-70.
24. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:493-520.
25. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 2004;150:1315-26.
26. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;38(1):42-51.
27. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* 2007;297(5):277-95.
28. Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S, et al. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* 2004;53:679-90.
29. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage Killing. *J Immunol* 2005;175:7512-8.
30. Marquart ME, Caballero AR, Chomnawang M, Thibodeaux BA, Twining SS, O'Callaghan RJ. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(10):3761-8.

31. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant Protein-A. PLoS One 2011;6(11):1-14.
32. Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:409-18.
33. Caballero A, Thibodeaux B, Marquart M, Traidej M, O'Callaghan R. *Pseudomonas* keratitis: Protease IV gene conservation distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(2):522-30.
34. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. Infect Immun 2004;72(7):4275-8.
35. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. Mol Microbiol 2004;53(4):1089-98.
36. Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: Role of interferon regulatory factor 1. Infect Immun 2002;70(3):1352-8.
37. Morris JD, Hewitt JL, Wolfe LG, Kamatkar NG, Chapman SM, Diener JM, Courtney AJ. Imaging and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming and rhamnolipid production. Appl Environ Microbiol 2011;77(23):8310-7.

38. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:1323-36.
39. Tanomand A, Farajnia S, Peerayeh SN, Majidi J. Cloning, Expression and Characterization of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein as a new vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Iran Biomed J* 2013;17(1):1-7.
40. Morlon-Guyot J, Méré J, Bonhoure A, Beaumelle B. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect Immun* 2009;77(7):3090-9.
41. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, et al. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: In vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *J Infect Dis* 2011;203(10):1369-77.
42. Hauser AR. The Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-65.
43. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000;68(7):3998-4004.
44. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klimik Derg* 2008;21(3):79-86.
45. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167-93.



46. Karaman M, Yılmaz O, Bayrakal V, Bahar İH. Gentamisin ve imipenem etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: İn-vivo modelleme. *Ankem Derg* 2010;24(2):76-81.
47. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: Evolving translational strategies. *Crit Care Med* 2009;37(5):1777-86.
48. Vahaboğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. ed. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2008:2175-86.
49. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(6):560-78.
50. Demir M, Cevahir N, Kaleli İ, Yıldırım U, Şahin R, Tepeli EÇ. Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008;42(2):197-208.
51. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest* 2011;139(4):909-19.
52. Güzel ÇB, Gerçeker AA. Kistik fibrozisin moleküler biyolojisi ve patogenezi. *İnfeks Derg* 2006;20(1):73-8.
53. Lin MF, Chen YL. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Treatment and outcome-an analysis of 56 episodes. *Infect Dis Clin Pract* 2006;14(3):150-3.

54. Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Macas A, Sakalauskas R. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina (Kaunas)* 2010;46(7):490-5.
55. Fang LC, Peng CC, Chi H, Lee KS, Chiu NC. *Pseudomonas aeruginosa* sepsis with ecthyma gangrenosum and pseudomembranous pharyngolaryngitis in a 5-month-old boy. *J Microbiol Immunol Infect* 2012;[PMID: 22727891].
56. De Vos FY, Middelburg TA, Seynaeve C, de Jonge MJ. Ecthyma gangrenosum caused by *Pseudomonas aeruginosa* in a patient with astrocytoma treated with chemotherapy. *J Infect Chemother* 2010;16(1):59-61.
57. Parikh TB, Nanavati RN, Udani RH. Noma neonatorum. *Indian J Pediatr* 2006;73(5):439-40.
58. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J Infect Public Health* 2009;2(3):101-11.
59. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J Immunol* 2012;188(4):1884-95.
60. Juhi T, Bibhabati M, Archana T, Poonam L, Vinita D. *Pseudomonas aeruginosa* meningitis in post neurosurgical patients. *Neurology Asia* 2009;14(2):95-100.
61. Wang MC, Liu CY, Shiao AS, Wang T. Ear problems in swimmers. *J Chin Med Assoc* 2005;68(8):347-52.

62. Liu PY, Shi ZY, Sheu WH. Malignant otitis externa in patient with diabetes mellitus. *Formos J Endocrin Metab* 2012;3(1):7-13.
63. Pınar E, Öncel S, Karagöz U, Şener G, Çallı Ç, Tatar B. Demonstration of bacterial biofilms in chronic otitis media. *Mediterr J Otol* 2008;4:64-8.
64. Almyroudis NG, Clarke LA, Tucci VT, Greene JN, Vincent AL. *Pseudomonas aeruginosa* infections of cartilaginous structures. *Asian Biomed* 2008;2(5):361-9.
65. Chachad S, Kamat D. Management of plantar puncture wounds in children. *Clin Pediatr* 2004;43(3):213-6.
66. Ohara T, Itoh K. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. *Intern Med* 2003;42(11):1072-6.
67. Çetinkaya M, Köksal N. Nekrotizan Enterokolit. *Güncel Pediatri* 2004;2(4):146-51.
68. Paköz Nİ, Doğan SŞ, Aral M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2011;25(2):73-8.
69. Eyigör M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2009;23(3):101-5.
70. Berktaş M, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Yaman G. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenbilir beta-laktamaz aktivitesi. *Fırat Tıp Derg* 2011;16(3):125-8.

71. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2007;37(3):142-6.
72. Özdemir M, Erayman İ, Türkdagi H, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Ankem Derg 2009;23(3):122-6.
73. Coşar M, Tuncer İ, Arslan U. Kan kültürlerinde üreyen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profili. İnfeks Derg 2009;23(2):47-50.
74. Türkdagi H, Arslan U, Fındık D, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. Ankem Derg 2011;25(2):107-10.
75. Akalın H. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları ve tedavisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 14-18 Mart 2007; Antalya. Klimik Derg 2007;20(özel sayı 1):208-14.
76. Öztürk CE, Albayrak HT, Altınöz A, Ankaralı H. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere direnç ve beta-laktamaz oranları. Ankem Derg 2010;24(3):117-23.
77. Üstün C. Hastane kökenli karbapenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. Ankem Derg 2010;24(1):1-6.
78. Jones RN, Stilwell MG, Rhomberg PR, Sader HS. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2007). Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65(3):331-4.

79. Uzun B, Güngör S, Yurtsever SG, Afşar İ, Demirci M. Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. *Ankem Derg* 2012;26(2):55-60.
80. Aktaş E, Terzi HA, Külah C, Cömert F. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi: çeşitli antibiyotiklere azalan duyarlılık. *Ankem Derg* 2010;24(4):188-92.
81. Altun HU, Ak S. İkinci basamak bir hastanede izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ege Tıp Derg* 2012;51(4):249-52.
82. Ağca H. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2011;41(3):107-10.
83. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *Ankem Derg* 2005;19(Ek 2):66-77.
84. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):582-610.
85. Durmaz B, Ağel HE. *P. aeruginosa*'da beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve direnç fenotipleri. *Hastane İnfeksi Derg* 2001;5:17-20.
86. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane İnfeksi Derg* 2001;5:210-29.
87. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:17-38.

88. Gülay Z. Kinolonlarda direnç problemi. *Ankem Derg* 2002;16(3):232-7.
89. Leblebicioğlu H, Şencan İ, Eroğlu C, Sünbül M, Esen Ş, Günaydın M. Gram-negatif bakterilerde aminoglikozid direnç mekanizmaları. *Klinik Derg* 1998;11(2):50-2.
90. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(11):4062-70.
91. Berktaş M, Çıkman A, Parlak M, Yaman G, Güdücüoğlu H. Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotiklere direnç. *Van Tıp Derg* 2011;18 (4):192-6.
92. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç, Ustaçelebi Ş. ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi 1999:91-108.
93. Marsik FJ, Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(12):1094-5.
94. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):969-76.
95. Öcal D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. *Ankem Derg* 2012;26(3):154-64.
96. Jacoby GA. AmpC Beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82.
97. Çetin EŞ, Tetik T, Kaya S, Arıdoğan BC. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeks Derg* 2009;23(2):51-5.

98. Thomson KH. Extended-spectrum beta-lactamase AmpC and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1019-25.
99. CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute), M100–S21 (cilt 31 sayı 1) (ISBN: 1-56238-742-1). (ISSN: 0273-3099), 2011.
100. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657-86.
101. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(1):42-52.
102. Nazik H, Öngen B, Sarıkaya A, Kuvat N, İlktaç M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarında CTX-M tipi beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik ko-rezistansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31(2):300-6.
103. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012;3:1-19.
104. Atilla A, Eroğlu C, Esen Ş, Sünbül M, Leblebicioğlu H. Hastane kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 tipi beta-laktamaz sıklığının ve antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(1):1-8.
105. Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995;35(2):281-94.
106. Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: Further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2829-34.

- 107.Aktaş Z, Satana D, Kayacan Ç, Can B, Gönüllü N, Küçükbasmacı Ö. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları ve beta-laktam direnç mekanizmalarının tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2012;46(3):386-97.
- 108.Söğüt MÜ, Yıldırım T, Birinci A, Durupınar B. Determination of PER-1 and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates by molecular methods. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(5):1227-35.
- 109.Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 2003;41(8):3542-7.
- 110.Kaçmaz B, Ece G. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin çift disk sinerji testinde kullanılması ve sefoksitin duyarlılığı. Ankem Derg 2010;24(2):61-4.
- 111.Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the E-test ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 2002;40(10):3703-11.
- 112.Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. Antimicrob Agents Chemother 1992;36(9):1877-82.
- 113.Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-51.



- 114.Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. baskı, İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları 2009:465-74.
- 115.Zarakolu P, Metan G, Haşçelik G, Akova M. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanmasında farklı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2005;39(3):265-72.
- 116.Akoğlu H. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde 2004-2005 yıllarında hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının moleküler tiplendirmesi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2007.
- 117.Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns 2010;36(1):70-4.
- 118.Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg 2009;23(2):54-8.
- 119.Dündar D, Tamer GS. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: üç yıllık değerlendirme. Ankem Derg 2009;23(1):17-21.
- 120.Güven Ö, Ünver D, Özdemir S, Gönüllü N, Küçükbasmacı Ö, Altaş K. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2008;38(3-4):112-6.

121. Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, et al. Prevalence of Antimicrobial-Resistant Pathogens in Canadian Hospitals: Results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(11):4684-93.
122. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(1):78-82.
123. Babay HA. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients in a teaching hospital, Riyadh, Saudi Arabia, 2001-2005. *Jpn J Infect Dis* 2007;60(2-3):123-5.
124. Pathmanathan SG, Samat NA, Mohamed R. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital. *Malays J Med Sci* 2009;16(2):27-32.
125. Van Eldere J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(2):347-52.
126. Akalın H. Kolistin. *Ankem Derg* 2007;21(Ek 2):26-8.
127. Öztürk O, Öztürk C, Delialioğlu N, Emekdaş G. Çoklu antibiyotik dirençli gram negatif bakterilerde kolistin duyarlılığının belirlenmesi. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2010;3(3):15-20.
128. Ateba NS, Ngaba GP, Ebongue CO, Ngassongo RO, Tsiagadigui JG, Behiya G, et al. Susceptibility to colistin of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Douala Laquintinie Hospital, Cameroon. *African J Pathol Microbiol* 2013;2:1-4.

- 129.Sümer Ş, Dikici N. Kolistin. Yoğun B Derg 2010;9(4):182-7.
- 130.Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. Ankem Derg 2011;25(1):42-7.
- 131.Gür D, Gülay Z, Akan ÖA, Aktaş Z, Kayacan ÇB, Çakıcı Ö ve ark. Türkiye'de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: çok merkezli hitit sürveyansının sonuçları. Mikrobiyol Bul 2008;42:537-44.
- 132.Kalem F, Gündem NS, Feyzioğlu F, Arslan U, Tuncer İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg 2008;22(3):123-6.
- 133.Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-Test ve disk diffuzyon yöntemleri ile araştırılması. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:33-6.
- 134.Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. J Med Microbiol 2007;56:956-63.
- 135.Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo AQ. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. BMC Infect Dis 2006;6:1-9.

- 136.Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008;13(47):1-11.
- 137.Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V, et al. Evaluation of the Osiris expert system for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3712-8.
- 138.Dede BY. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları (Tıpta Uzmanlık Tezi). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2006.
- 139.Okesola AO, Oni AA. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in South-West Nigeria. *Res J Med Sci* 2012;6(3):93-6.
- 140.Begum S, Salam MA, Alam KhF, Begum N, Hassan P, Haq JA. Detection of extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas* spp. isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. *BMC Res Notes* 2013;6:1-4.
- 141.Zarakolu P, Metan G, Aydın NG, Altun B, Haşçelik G, Akova M. Hastane kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 türü genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin sıklığı. *Mikrobiyol Bul* 2007;41(3):363-7.
- 142.Çelik N. Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta-laktamazların incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;38(1):5-11.
- 143.Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(8):2385-92.

144. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1749-51.
145. Claeys G, Verschraegen G, de Baere T, Vaneechoutte M. PER-1 beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2000;45(6):924-5.
146. Vahaboglu H, Saribaş S, Akbal H, Ozturk R, Yucel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(2):269-70.
147. Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):122-7.
148. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas Mdel M, Faris C, Vardhan MS, Dawson S, Cotterill SL, Livermore DM. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(6):1265-8.
149. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. *J Chemother* 2007;19(2):140-5.
150. Durmaz R. Hastane infeksiyonu salgınında moleküler biyolojik yöntemler. *Hastane İnfeks Derg* 2005;9(4):196-202.

- 151.Eraç B. Hastane kökenli gram-negatif bakterilerde PER-1 enziminin moleküler epidemiyolojisi (Doktora Tezi). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2006.
- 152.Eraç B, Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, Taşlı H, Aydemir Ş. Prevalence of blaPER-1 and integrons in ceftazidime-resistant gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2013;66(2):146-8.
- 153.Söğüt MÜ. Ceftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 ve OXA-10 benzeri beta-laktamazların moleküler yöntemlerle belirlenmesi (Doktora Tezi). Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.