T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARINDA BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİ VE BİYOFİLM VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Tuğçe SOYLAMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Emine İnci TUNCER

Konya-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARINDA BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİ VE BİYOFİLM VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Tuğçe SOYLAMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Emine İnci TUNCER

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15202009 proje numarası ile desteklenmiştir.

.

Konya-2016

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına bağlı Mikrobiyoloji Laboratuvarında yaptığım "Çeşitli Kliniklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Beta-Laktamaz Üretimi ve Biyofilm Oluşumunun Araştırılması" konulu tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve görüşleriyle yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. E. İnci TUNCER'e, çalışmama göstermiş oldukları ilgi ve desteklerinden dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK, Sayın Doç. Dr. Uğur ARSLAN, Sayın Doç. Dr. Hatice TÜRK DAĞI'na, çalışmama başladığım günden beri destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Şerife Merve GÖK, Aslıhan DEMİRCAN, Nurullah ÇİFTÇİ ve Hilal KÖYLÜOĞLU'na, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, yüksek lisansa başladığım ilk günden beri desteklerini esirgemeyen ilgili herkese teşekkür ederim.

Ayrıca bana vermiş oldukları güven ve destekten dolayı, varlıklarını her zaman hissettiğim, kalplerinde sonsuz sevgi, anlayış ve sabır taşıyan canım aileme sonsuz sevgiler sunuyorum.

Tuğçe SOYLAMIŞ

Konya/ 2016

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
ÖZET ..... **vii**
SUMMARY ..... **viii**
ÇİZELGE VE ŞEKİLLER ..... **ix**
1.GİRİŞ **1**
1.1. *Pseudomonas aeruginosa* 2
1.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler 3
1.1.2. Epidemiyoloji ve Patogenez 4
1.2. Virulans Faktörleri 5
1.2.1. Yapısal Bileşenler 6
1.2.1.1. Polisakkarit Kapsül 6
1.2.1.2. Fimbria (Pilus) 6
1.2.1.3. Lipopolisakkarit 7
1.2.2. Toksin ve Enzimler 7
1.2.2.1. Ekzotoksin A 7
1.2.2.2. Ekzotoksin S ve T 7
1.2.2.3. Alkalin Proteaz 7
1.2.2.4. Elastaz 8
1.2.2.5. Piyosiyanin 8
1.2.2.6. Piyoverdin 8
1.2.3. Diğer Virulans Faktörler 8
1.2.3.1. Biyofilm 8
1.2.3.2. Quorum Sensing 9
1.3. *P. aeruginosa*'nın Neden Olduğu İnfeksiyon Hastalıkları 9
1.3.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları 9
1.3.2. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları 10
1.3.3. Üriner Sistem İnfeksiyonları 10
1.3.4. Bakteremi ve Endokardit 10
1.3.5. Merkezi Sinir Sistemi İnfeksiyonları 10
1.4. Laboratuvar Tanısı 11
1.5. Tedavi 11
1.5.1. Beta-Laktam Antibiyotikler 12

1.5.1.1. Penisilinler....13
1.5.1.2. Sefalosporinler....13
1.5.1.3. Monobaktamlar....13
1.5.1.4. Karbapenemler....13
1.5.1.5. Beta- Laktamaz İnhibitörleri....14
1.5.2. Aminoglikozidler....14
1.5.3. Kinolonlar....14
1.6. *P. aeruginosa*'da Sık Görülen Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları....15
1.6.1. Aktif Pompa (Efluks) Sistemi....15
1.6.2. Dış Membran Porin Defektleri....16
1.6.3. Enzim üretimi....17
1.6.3.1. Beta-Laktamazlar....17
1.6.3.2.Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler....21
1.7. Mutasyona Bağlı Direnç....22
1.8. Biyofilm....22
1.8.1. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı....22
1.8.2. Biyofilmin Oluşum Aşamaları....23
1.8.3. Biyofilm Oluşumunun Önemi....24
1.8.4. Tıbbi İnfeksiyonlar ve Biyofilm İlişkisi....25
2. GEREÇ VE YÖNTEM....26
2.1. Bakterilerin Tanımı ve İzolasyonu....26
2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar....26
2.3. İndüklenebilir Beta-laktamaz Üretimin Araştırılması....28
2.4. Metallo-beta-laktamaz Üretiminin Araştırılması....28
2.4.1. ModifiyeHodge Testi....29
2.4.2. İmipenem/İmipenem +EDTA G-Test....29
2.5. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması....29
2.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri....30
3.BULGULAR....32
4.TARTIŞMA....38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER....45
6. KAYNAKLAR....46
7. ÖZGEÇMİŞ....52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHLs : Açil Homoserin Lakton Molekülleri
AIDS : Aquired Immune Deficiency Syndrome
AK : Amikasin
ATCC : American Type Culture Collection
ATM : Aztreonam
CAZ : Seftazidim
CN : Gentamisin
DNA : Deoksiribonükleik Asit
EARSS : Europen Antimicrobial Resistance Surveillance System
ECM : Ekstraselüler matriks
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
EMB : Eozin Metilen Blue
EPIC : Europen Prevalence Infection Intensive Care
EPS : Ekzopolisakkarit
Exo A : Ekzoenzim A
Exo S : Ekzoenzim S
Exo T : Ekzoenzim T
Exo Y : Ekzoenzim Y
FEP : Sefepim
GSBL : Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz
G-test :Gradient test
İBL : İndüklenebilir beta-laktamaz
KF : Kistik fibröz
LasA :Serin proteaz
LasB : Çinko metalloproteaz
LB : Luria bertani broth
LEV : Levofloksasin
LPS : Lipopolisakkarit
MBL : Metallo-Beta-Laktamaz
MDR : Multi Drug Resistance
MEM : Meropenem
MHA : Mueller Hinton Agar

MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
OXA	: Oksasilinaz
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
QS	: Quorum-Sensing
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TOB	: Tobramisin
TPZ	: Piperasilin/tazobaktam
UV	: Ultraviyole
°C	: Santigrat derece
µm	: Mikrometre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Beta-Laktamaz Üretimi ve Biyofilm Varlığının Araştırılması

Tuğçe SOYLAMIŞ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA, 2016

Fırsatçı patojenlerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermesi ve buna bağlı olarak tedavi başarısızlıkları ile sık karşılaşılması nedeniyle özellikle hastane infeksiyonlarında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç durumları, indüklenebilir beta-laktamaz, metallo-beta-laktamaz üretimi varlığı ve biyofilm oluşumunun araştırılması amaçlanmıştır.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2013-2015 tarihleri arasında farklı kliniklerden gelen örneklerden, üreyen toplam 100 *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edildi. Bakterilerin identifikasyonu standart klinik mikrobiyolojik yöntemlerle belirlendi ve tür tayini için VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanıldı. Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing standartları doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. İndüklenebilir beta-laktamaz üretimi Mueller Hinton agarda ortaya imipenem diski 20 mm uzağına aztreonam ve seftazidim diskleri yerleştirilerek test edildi. Metallo-beta-laktamaz oluşumu ise Modifiye Hodge ve imipenem/imipenem+EDTA Gradient-test yöntemi ile araştırıldı. Biyofilm varlığı mikroplate yöntemi ile araştırıldı.

P.aeruginosa suşlarında sırası ile aztreonama (%86), piperasilin/tazobaktama (%48), seftazidime (%40), meropeneme (%24), imipeneme (%22), levofloksasine (%20), gentamisine (%10), amikasine ve sefepime (%6), tobramisine (%3) oranında direnç gözlendi. İzolatlarımızda indüklenebilir beta-laktamaz pozitifliği %89, metallo-beta-laktamaz üretimi Modifiye Hodge test yöntemi ile %20, IMP/IMP+EDTA Gradient-test yöntemi ile %17 oranında pozitiflik saptandı. Suşlarımızın 8'inde (%8) biyofilm oluşumu belirlendi.

Beta-laktamaz aktivitesi gösteren ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *P.aeruginosa* kökenlerinin saptanması, aynı zamanda antibiyotiklere direncin belirlenmesi, tedavide kullanılacak antibiyotik seçiminde ayrıca tedavinin takibi ve infeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır. Sonuç olarak; Antibiyotiklere direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmaları bilinmeli ve direnç gelişimi önlenmelidir.

Anahtar sözcükler: İndüklenebilir Beta-Laktamaz üretimi; Metallo-Beta-Laktamaz üretimi; Biyofilm; *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Beta-Lactamase Production and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Clinical Specimens

Tugce SOYLAMIS

Department of Medical Microbiology

MASTER THESIS/KONYA-2016

Pseudomonas aeruginosa is one of the opportunistic pathogens. Resistance to antimicrobial agents and consequently treatment failures are frequently encountered as an important problem especially in hospital infections. In this study, it was aimed to investigate inducible beta-lactamase production, metallo-beta-lactamase production, biofilm formation and the antimicrobial resistance status of *P.aeruginosa* strains.

The study include 100 P.aeruginosa strains from different clinical samples between the years 2013-2015 that determined at Selcuk University Medical Faculty Microbiology Labratory. The description of the bacteria was determined by Standard clinical microbiological methods and the VITEK 2 automated system (bioMerieux, France) was used for identification of species. The antimicrobial susceotibility tests of the bacteria were carried out by disk diffusion method and evaluated according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing standards.

Inducible beta-lactamase production was tested in Mueller Hinton agar by placing, imipenem in the middle at the agar plate and 20 mm away from imipenem aztreonam and ceftazidime dics wereplaned. Production of Metallo-beta-lactamase was investigated by Modified Hodge and imipenem/imipenem+EDTA gradient-test method. Presence of biofilm was investigated by micoplate method.

Antimicrobial resistance rate of *P. aeruginosa* strains have been found against aztreonam (86%), piperacillin / tazobactam (48%), ceftazidime (40%), meropenem (24%), imipenem (22%), levofloxacin (20%), gentamicin (10%), amikacine and cefepime (6%) and tobramycin (3%). Respectively inducible beta-lactamase positivity have been found %89 and metallo-beta-lactamase production have been found %20 by Modified Hodge Test method and %17 by IMP/IMP+EDTA Gradient- Test method. Biofilm formation have been detected at %8 strains.

Identification of *P. aeruginosa* strains, exhibiting beta-lactamase activity and biofilm-forming ability and determination of antimicrobial resistance and selection of antibiotics to be used in treatment will guide the development of follow-up care and infection control programs. As a result; antimicrobial resistance is a serious health in our country as well world. Fort his reason, antibiotic resistance mechanisms should be known and development of resistance should be prevented.

Keywords: Inducible Beta-Lactamase production; Metallo-Beta-Lactamase production; Biofilm formation; *Pseudomonas aeruginosa*

ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Çizelge 1.1.	Klinik olarak önemli *Pseudomonas*'ların gruplandırılması……..	3
Çizelge 1.2.	*Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri……	4
Çizelge 1.3.	*P. aeruginosa*'nın virulans faktörleri ve fonksiyonları……	6
Çizelge 1.4.	*P. aeruginosa'da* bulunan efluks pompa sistemleri…….	16
Çizelge 1.5	Beta-laktamazların sınıflandırılması…….	18
Çizelge 2.1.	Çalışmamızda kullanılan antibiyotik disk ve içerikleri……	31
Şekil 3.1.	İzole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinin klinik örneklere göre dağılımı…….	32
Şekil 3.2.	Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının kliniklere göre dağılımı.	33
Şekil 3.3.	*P.aeruginosa* suşunda İBL pozitif suş. Çalışmamızdan……..	33
Şekil 3.4.	Modifiye Hodge Test yöntemi. Çalışmamızdan……...	34
Şekil 3.5.	IMP/IMP+EDTA G-Test MBL üretimi pozitif suş. Çalışmamızdan……..	34
Çizelge 3.1.	Modifiye Hodge ve E Test bulgularının dağılımı…….	35
Şekil 3.6.	Mikroplate yönteminde biyofilm oluşumu. Çalışmamızdan……	36
Çizelge 3.2.	100 *P.aeruginosa* suşunun antimikrobiyallere dirençlilikleri…..	36
Şekil 3.7.	*P.aeruginosa izolatlarının* antibiyotiklere dirençlilik oranları….	37
Çizelge 3.3.	*P.aeruginosa* suşlarında en dirençli antimikrobiyallerin İBL, MBL varlığı ve biyofilm oluşum yüzdelerinin dağılımı……...	37

1.GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa hastane kaynaklı infeksiyon etkenlerinden sorumlu önemli bir patojendir. Bu bakteri, doğal bağışıklık sistemlerinin zarar gördüğü durumlarda; kistik fibrozisli, üriner katater ve venöz kateter bulunan, kemoterapi uygulanan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan hastalarda sık infeksiyona neden olmaktadır (Kiska ve Gilligan 2003). *P.aeruginosa* kökenleri birçok antibiyotiğe doğal direnç göstermesinin yanı sıra kullanımda olan antimikrobiyal ajanlara karşı tedavi sırasında da edinsel direnç geliştirmektedir. Buna bağlı olarak *P.aeruginosa* kaynaklı infeksiyonların tedavisi giderek zorlaşmaktadır (Karlowsky ve ark 2003).

Hastane infeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* kökenleri her geçen gün antibiyotik direnci konusunda ve beta-laktam grubu antibiyotiklere kazanılmış direnç mekanizmaları ile dikkat çekmektedir. Bakterilerin beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerini sentezlemesi, beta-laktam antibiyotiklere karşı en çok gözlenen direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar, kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilir ve etkilerini beta-laktam grubu antibiyotiklerin beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak gösterir (Bush 2001). *P.aeruginosa* suşları, sahip olduğu bütün enzimatik ve mutasyona bağlı direnç mekanizmalarını birlikte kullanabilmesine rağmen sıklıkla beta-laktamaz aracılı direnç mekanizması ile karşılaşılmaktadır (Fidan ve ark 2005).

Biyofilm, inert ya da canlı bir yüzeye yapışarak, ekstraselüler polimerik bir madde içinde yaşayan ve aralarında haberleşerek bütünlüklerini devam ettiren bakterilerin oluşturduğu kompleks bir yapıdır (Çiftçi ve ark 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hastane kaynaklı infeksiyonlarda patojenlerin oluşturdukları biyofilmlerin tedavi amaçlı kullanılan birçok antimikrobiyale direnç geliştirmesi nedeniyle önemi artmıştır. Biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* suşlarının kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla akciğer infeksiyonuna neden olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra imipenem ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerin, ekzopolisakkarit alginat direncini uyardığı ve biyofilm miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Bagge ve ark 2004).

Çalışmamızda Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnç oranlarının, indüklenebilir beta-laktamaz ve metallo-beta-laktamaz aktivitesinin ve biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeurigonasa, mortalite ve morbiditesi yüksek hastane infeksiyonlarına neden olan önemli bir patojendir (Bagge ve ark 2004). Doğada yaygın olarak görülmekle birlikte, hastane ortamında ve özellikle nemli yüzeylerde bulunmaktadır. İnsanlarda immün sistemin baskılandığı durumlarda fırsatçı patojen olarak ortaya çıkmaktadır (Brooks ve ark 2007).

P. aeruginoasa, Pseudomonadaceae familyasında ve *Pseudomonas* cinsinde yer almaktadır (Erdem 1999). *Pseudomonas*'ın tarihi 1850 yılında, Sedillot tarafından Fransız askerlerin yara pansumanlarında mavi-yeşil renkli oluşumları tanımlamasıyla başlamıştır. Bu oluşumlar ilk olarak 1882 yılında *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirilmiştir. Migula, 1990 yılında, Yunanca'da "pseudos" yalancı ve "monas" birim anlamına gelen kelimelerin birleştirilmesi ile *Pseudomonas* olarak adlandırmıştır (Pitt ve Simpson 2006). 1960'lı yıllarda DNA hibridizasyon yöntemi ile genotipik olarak sınıflandırılmıştır, 1984 yılında ise Palleroni, rRNA homolojilerine göre *Pseudomonas*'ları gruplandırmıştır (Brooks ve ark 2007). Klinik olarak önemli *Pseudomonas*'ların rRNA homolojilerine göre gruplandırılması **Çizelge1.1**.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Klinik olarak önemli *Pseudomonas*'ların gruplandırılması (Brooks ve ark 2007).

rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu	Cins ve Tür
Grup I	*Pseudomonas aeruginosa*
	Pseudomonas fluorescens
Fluoresan Grubu	*Pseudomonas putida*
Non Fluoresan Grubu	*Pseudomonas stutzeri*
	Pseudomonas mendocina
Grup II	*Burkholderia pseudomallei*
	Burkholderia mallei
	Burkholderia cepacia
	Ralstonia pickettii
Grup III	*Comamonas* türleri
	Acidovorax türleri
	Delftia türleri
	Hydrogenophoga türleri
GrupIV	*Brevundimonas* türleri
GrupV	*Stenotrophomonas maltophilia*
	Xanthomonas türleri

1.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler

P. aeruginosa, 1,5- 3 μm boyunda, 0,5- 0,8 μm genişlikte Gram negatif, sporsuz, hareketli bir basildir. Zorunlu aerop olan *P. aeruginosa*'nın optimal üreme sıcaklığı 37° C'dir. Kanlı agarda beta hemoliz yapar. Bazıları besiyerinde mavi-yeşil renkte piyosiyanin, yeşil-sarı renkte piyoverdin, kırmızı-kahve renkte piyorubin pigmenti oluşturur. Klinik infeksiyonlardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında piyosiyanin pigmentine sık rastlanılmakta olup bu pigmentten dolayı "aeruginosa" ismi verilmiştir. Bu suşlarda piyosiyanin oluşumuna bağlı yeşil pigmentin görülmesi ve yapısındaki 2-aminoasetofenondan dolayı kültürdeki aromatik kokunun varlığı bakterinin tanımlanmasında yardımcı kriterdir (Erdem 1999).

Klinik olarak önemli *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri **Çizelge 1.2.**'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. *Pseudomonas* türlerinin biyokimyasal özellikleri (Winn ve ark 2006).

Türler	Hareket	Oksidaz	Katalaz	Jelatinaz	42°'de üreme	Nitrat redüksiyonu	Piyoverdin üretimi	Maltoz kullanabilme	Mannitol kullanabilme	Asetamid üretimi
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	d	+	+	+	d	d	+
Pseudomonas fluorescens	+	+	+	+	-	-	+	d	+	-
Pseudomonas mendocina	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Pseudomonas putida	+	+	+	-	-	-	+	d	d	-
Pseudomonas stutzeri	+	+	+	-	-	+	-	+	d	-

+:pozitif, -: negatif, d:değişken

1.1.2. Epidemiyoloji ve Patogenez

P. aeruginosa çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilme özelliğine sahip bir bakteridir. Doğada, çiğ sebze ve meyvelerde, su ve toprak üzerinde bulunmaktadır. Besin maddelerinin az olduğu farklı ortam ve fiziksel koşullarda üreyebilmesi uyum sağlama özelliğinin olduğunu göstermektedir. İnsanlarda özellikle perine, aksilla, nazal mukoza, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelerde kolonize olması florada etkin olduğunu göstermektedir (Brady 2009). Nemli bölgelerde kolaylıkla üreyebilmesi, kontamine tuvalet ve musluk başları, sabunlar, temizlik aletleri, endoskopi, kolonoskopi gibi nemli cansız yüzeylerde rezervuar durumunda olmasına olanak sağlamıştır (Kerr ve Snelling 2009).

P. aeruginosa infeksiyonunun patogenezi 3 aşamada gerçekleşir.

1. Bakteri kolonizasyonu
2. İnvazyon
3. Sistemik yayılım

Bakteri dış membran elemanlarından olan fimbria (pilus) aracılığı ile konak epitel yüzeyine tutunur ve üremeye başlar. Kolonize olan bakteriler konağın diğer sistemlerine yayılarak farklı infeksiyonlara neden olur. Endotoksin, ekzotoksin, piyosiyanin, piyoverdin, alginat gibi enzim ve toksinleri salgılaması doku hasarına yol açar ve hastalığa neden olur (Vahaboğlu ve Akhan 2008).

P. aeruginosa çok sık rastlanan bir bakteri olmasına rağmen sağlıklı kişilerde nadiren infeksiyon etkeni olarak ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı bireylerin vücut bölümlerinde; ciltte % 0-2; burun mukozasında %0-3,3; boğazda %0-6,6; dışkıda % 2,6- 24 oranında kolonize olmaktadır. Hastanede yatan hastalarda bu kolonizasyon %50'yi geçmektedir. Ventilasyon ve katater kullanılan ciddi derecede yanıklı hastalarda kolonizasyon oranları artmaktadır. *P. aeruginosa* birçok antibiyotik ve dezenfektana direnç gösterebilmektedir. Bu bakterinin, konakta immün sistemin baskılandığı durumlarda floraya hakim olması söz konusudur (Lister ve ark 2009).

1.2. Virulans Faktörleri

P. aeruginosa'nın, hastalıkta rol aldığı kabul edilen yapısal bileşenleri, ayrıca toksin ve enzim niteliğinde çok sayıda virulans faktörü bulunmaktadır. Bu bakterinin hastalık oluşturabilmesi için bu virulans faktörlerinden birçoğunun bir arada bulunması gerekmektedir (Erdem 1999). *P.aeruginosa*'nın virulans faktör ve fonksiyonları **Çizelge1.3**'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. *P. aeruginosa'nın* virulans faktörleri ve fonksiyonları (Moore ve Flaws 2011).

Virulans Faktörü	Fonksiyonu
Flagella	Hareket edebilme yeteneği, konak hücreye bağlanma, IL-8 aktivasyonu
Fimbria	Konak hücreye bağlanma ve proinflamatuvar gen ekspresyonunun aktivasyonu
Lipopolisakkarit	Endotoksin, septik şok ve bazı antibiyotiklere direnç
Alginat	Serbest radikal tutucu, fagositozun, nötrofil kemotaksisinin ve kompleman aktivasyonunu inhibisyonu
Piyosiyanin	Lenfosit proliferasyonunun ve siliya fonksiyonlarının inhibisyonu, oksijen radikallerinin üretimi
Piyoverdin	Demirin bağlanması
Elastaz, proteazlar, hemolizinler ve lökosidin	Doku invazyonu ve konak hücre lizisi
Ekzotoksin A	Konak hücrede protein sentezinin inhibisyonu, organizmanın yayılımı
Quorum Sensing	Diğer *Pseudomonas*'ların gen ekspresyonunun koordinasyonu ve biyofilm oluşumu
Tip III Salgılama Sistemi	Toksinlerin konak hücreye enjeksiyonu (Exo S, Exo T, Exo U, Exo Y)
Exo S	Tümör nekrozis faktör stimülasyonu
Exo T	GTPaz aktivasyonu
Exo U	Sitotoksin
Exo Y	Adenilat siklaz aktivasyonu

1.2.1. Yapısal Bileşenler

1.2.1.1. Polisakkarit Kapsül

P.aeruginosa birçok işlevi olan polisakkarit yapıda kapsül üretmektedir. Hem adezyon faktörü hem de antifagositer olarak işlev gören kapsül, aynı zamanda da immünojeniktir. Kapsülde yer alan mukoid ekzopolisakkarit yapıdaki alginat, bakteriyi fagositozdan ve antibiyotik etkisinden korur. Kolonize olunan bölgede nitrojen miktarının azalması üretimini tetiklemektedir (Murray ve ark 2009).

1.2.1.2. Fimbria (Pilus)

P. aeruginosa'nın hücre yüzeyinde bulunan ve konak epitel hücrelerine tutunmasına yardımcı olan flamentöz yapılı dış membran elemanıdır. Kolonizasyonun adezyon fazında epitel hücre membranlarının asialo-GM1 bölgesine

bağlanarak patogenezde kritik önem taşır. Ayrıca pilus organizmanın biyofilm oluşturmasına yardımcı olur (Zar ve ark 1995).

1.2.1.3. Lipopolisakkarit

*P. aeruginosa'*nın dış membran yüzey elemanı olup adezyonda görev alan önemli bir virulans faktördür. Lipopolisakkarit bileşen olarak 3 yapıdan oluşur. Bunlar; lipid A, kor polisakkarit ve O özgül antijen polisakkarittir. Lipid A endotoksik aktiviteden sorumludur ve kistik fibrozis hastalarında akciğerdeki doku hasarına neden olmaktadır. Kor polisakkarit, 7 karbonludur ve tüm Gram negatif bakterilerde aynıdır. *P.aeruginosa* kor polisakkaritinin fosforilasyonu bakteriyel canlılık için gereklidir. O özgül antijeni bakteriyi fagositozdan korur ve serotiplendirmede görevli kısımdır. *P.aeruginosa'*da 20 çeşit serotip tespit edilmiştir (King ve ark 2009).

1.2.2. Toksin ve Enzimler

1.2.2.1. Ekzotoksin A

*P. aeruginosa'*nın ürettiği önemli virulans farktörlerinden biridir. Ekzotoksin A, ökaryot hücredeki elongasyon faktör 2'yi (EF2) inhibe eder ve protein sentezini bozan hücre dışı enzimdir. Lokal doku invazyonunda rolü vardır (Zar ve ark 1995).

1.2.2.2. Ekzotoksin S ve T

*P. aeruginosa'*nın ürettiği hücre dışı enzimlerdir. ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. Protein sentezi inhibisyonu ile epitel hücrelerinde hasar, doku invazyonu ve nekrozu kolaylaştırıcı etkisi vardır (Moore ve Flaws 2001).

1.2.2.3. Alkalin Proteaz

Konağın immün sisteminde bulunan fibronektin artışını azaltır ve bakterinin konak hücresine tutunmasına yardım eder. *P. aeruginosa* izolatlarının %90'ının hücre dışı proteaz ürettiği bildirilmiştir (Handerson ve Nataro 2001).

1.2.2.4. Elastaz

P. aeruginosa'nın konak savunmasından kaçışında görevlidir. Albümin, fibrin ve elastini parçalama özelliğine sahiptir. Damar duvar bileşenlerinde çok miktarda elastine rastlanmaktadır. Nötrofil kemotaksisini engelleyerek, doku invazyonuna neden olmaktadır. Elastin sinerjistik indirgeme özelliğindeki LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) elastin bulunduran dokuların hasarına yol açar (Murray ve ark 2008).

1.2.2.5. Piyosiyanin

Bakterinin mavi-yeşil pigment oluşturmasından sorumludur. Piyosiyanin üretimi Quorum-Sensing (QS) sistemi ile düzenlenir. Ortamdaki diğer bakterileri inhibe eder ve konağın solunumunu baskılar. Siliyer fonksiyonu ve kalsiyum dengesini bozduğu tespit edilmiştir (Lau ve ark 2004).

1.2.2.6. Piyoverdin

Bakterinin, sarı-yeşil renkli pigmentidir. Ultra-viyole (UV) ışınında floresens verir. Demiri bağlama özelliği olan bir sideroformdur. *P. aeruginosa*'nın üreme ve virulans faktörleri içinde en önemlilerinden birisidir. Ekzotoksin A üretiminde rol oynadığı bilinmektedir (Karatuna ve Yağcı 2008).

1.2.3. Diğer Virulans Faktörler

1.2.3.1. Biyofilm

Ekstraselüler polimerik matriks içinde mikroorganizmanın gömülü olduğu salgısal bir yapıdır. Yüzeye ve bakterilerin birbirlerine tutunarak yapışmasını sağlamaktadır. Biyofilm içine gömülü olan bakteri fenotipik ve bakteriyel olarak değişimlere uğradığından birçok dezenfektan ve antibiyotiğe direnç göstermektedir. Biyofilm, QS sisteminin kontrolündedir (Sadovskaya ve ark 2010).

1.2.3.2. Quorum Sensing

P. aeruginona kolonize olduğu bölgede açil homoserin lakton molekülü (AHLs) üretmektedir. Artan AHLs miktarı yeterli konsantrasyona ulaştığında transkripsiyonel regülatörleri indüklemektedir. QS sistemi, bakterinin ürettiği ve çevredeki bakterilerin algıladıkları sinyal moleküllerini içerir. *P.aeruginosa*'nın patogenezinde QS sistemi önemli bir faktördür. AHLs molekülleri kistik fibröz hastalarının akciğer dokularında da görülmüştür (Pitt ve Simpson 2006).

1.3. *P. aeruginosa'*nın Neden Olduğu İnfeksiyon Hastalıkları

P. aeruginosa insanlarda birçok infeksiyona neden olan fırsatçı önemli bir patojendir. Hastane ortamına kolay uyum sağlaması nedeniyle dirençli suşların oldukça arttığı gözlenmektedir (Karlowsky ve ar 2003).

P. aeruginosa infeksiyonlarının görülebilmesi için bakterilere ait virulans faktörlerinin dışında insanlara ait faktörlerin de uygun olması gerekmektedir; vücut direncinin baskılanmış olması, yaşlılık, immün süpresif ilaç kullanımı, yeni doğanlar ve özellikle prematüre bebekler *P. aeruginosa* infeksiyonlarına karşı duyarlıdır. Sağlıklı kişilerde, bakterilerin çeşitli yollardan savunma mekanizmasını atlayarak doku içine girmeleri için tıbbi girişimler; örneğin katater, solunum cihazı, sonda uygulaması vb. işlemler gerekmektedir. Ayrıca yanık yaraları gibi doku hasarı bulunanlarda bakterinin girişi ve yerleşmesi kolaylaşmaktadır (Bilgehan 2000).

1.3.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları

*P.aeruginosa'*nın etken olduğu solunum yolu infeksiyonları sıklıkla klinikte entübasyon, bronkoskopi ve diğer solunum cihazlarının uygulanması sonrası ortaya çıkmaktadır. Ayrıca konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında hasar olduğu durumlarda görülür. *P. aeruginosa*, alt solunum yolu infeksiyonu olarak karşımıza çıktığında, treakeobronşit gibi hafif seyreden ya da nekrotizan pnömoniye neden olan ciddi klinik durumlarda ortaya çıkabilmektedir. (Bilgehan 2000). Kistik fibröz hastalarında, kronik akciğer hastalığı olanlarda ve nötropenisi olan hastalarda görülme sıklığı oldukça fazladır. Bu hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının

çoğunlukla mukoid yapıda ve çoğu antibiyotiğe dirençli olduğu bilinmektedir (Murray ve ark 2008).

1.3.2. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları

P. aeruginosa apse, yanık yaraları, ektima gangrenozum, püstüler deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının başlıca nedeni olarak gösterilmektedir. İnfeksiyon lokal ya da yaygın olarak görülebilir. Ciddi yanık sonucu oluşan yaralarda kolonize olarak doku invazyonuna sebep olmaktadır (Murray ve ark 2008). Yanık olan bölgenin nemli olması ve nötrofillerin yaraya ulaşabilmesinin zorlaşması sonucu hastalar, bu infeksiyona dirençsiz hale gelmektedir. *P. aeruginosa*, yara olan bölgenin iyileşmesini engelleyen ve fibrinin parçalanmasına sebep olan plazminojen enzimini salgılamaktadır (Maejima ve ark 1984).

1.3.3. Üriner Sistem İnfeksiyonları

Üriner sistemde görülen *P. aeruginosa* infeksiyonları çoğunlukla kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenlidir. *Pseudomonas* bakteriyemilerinde %40 gibi yüksek oranda üriner sistem primer odağı oluşturur. Üriner sistem girişimleri, böbrek transplantasyonu gibi cerrahi işlemler, üriner sistem taş hastalıkları, kronik prostatit *P. aeruginosa* infeksiyonuna zemin hazırlayan önemli risk faktörleridir (Vahaboğlu ve Akhan 2008).

1.3.4. Bakteremi ve Endokardit

P. aeruginosa'dan kaynaklanan bakteremininin mortalitesi diğer bakteremilerden daha yüksektir. Nötropenik, immün sistemi baskılanmış kişilerde, geniş yanıklı, hemotolojik maligniteli ve diabetik hastalarda görülme sıklığı fazladır (Murray ve ark 2008).

P. aeruginosa ilaç bağımlısı olan hastalarda protez veya doğal kalp kapaklarına yerleşir ve infektif endokardite neden olur (Vahaboğlu ve Akhan 2008).

1.3.5. Merkezi Sinir Sistemi İnfeksiyonları

P. aeruginosa menenjit ve beyin abselerine neden olabilmektedir. Kulak ve sinüsteki infeksiyonların yayılması, üriner ve solunum sistemleri kaynaklı

bakterenin gelişimi ile görülebilir. Ayrıca Aquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) hastalarında ilerleyen evrelerde *P. aeruginosa* infeksiyon nedeni olabilmektedir (Vahaboğlu ve Akhan 2008). Kanser hastalarında *Listeria monocytogenes'*den sonra ikinci sırada menenjit etkeni olarak gösterilmektedir (Erdem 1999).

1.4. Laboratuvar Tanısı

İncelenecek örnekler infeksiyon bölgesine göre balgam, idrar, beyin, omurilik sıvısı, trakeal aspirat, püy, yanık sürüntüleri ve kandan alınabilir. Seçici besiyerleri olarak McConkey ve agar Eozin Metilen Blue (EMB) agar, genel besiyeri olarak %5'lik koyun kanlı agar, MHA (Mueller Hinton Agar), triptik soy agar, gibi besiyerlerinde 37°C'de kolaylıkla ürerler. Kültürde aromatik kokunun varlığı, pigment oluşumu, mukoid ve hemolitik koloni oluşturması kolayca tanı koydurur.

Mikroskobik incelemelerde Gram negatif, çomak şeklinde görülmekte ve oksidaz pozitif olması ile diğer Gram negatif bakterilerden ayırt edilebilmektedir. Ayrıca 41-42°C'de üreyebilmesi de önemli ve ayırt edici bir özelliğidir (Kiska ve Gilligan 2002).

Alginat üretme yeteneği olan suşlarda mukoid M tipi koloni, az üreten ya da hiç üretemeyen suşlarda R tipi koloni oluşur. Pigment oluşturma yeteneği olmayan suşların glikoz oksidasyonu, alginin dihodrolizi ayırt edici olmaktadır (Bilgehan 2000). Laboratuvarlarda uygulanan rutin biyokimyasal testler dışında cins ve tür tayini için tanımlamada ticari otomatize cihazlar sıklıkla kullanılmaktadır (Çakar 2005).

1.5. Tedavi

P. aeruginosa infeksiyonlarında bakterinin birçok antibiyotiğe direnç geliştirebilmesi nedeniyle tedavisi oldukça güçtür (Erdem 1999). Geniş spektrumlu penisilinler (azlosilin, mezlosilin, tikarsilin, piperasilin), üçüncü kuşak sefalosporinler (sefaperozon, seftazidim), karbapenemler (imipenem, meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (amikasin, gentamisin), florokinolonlar (siprofloksasin) ve polimiksinler (polimiksin B ve kolistin)

Pseudomonas türlerine oldukça etkili antibiyotiklerdir. Tedavide önerilen aminoglikozidlerin beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilerek verilmesidir. Monoterapinin de antimikrobiyal ajanın erken ve uygun dozda verilmesi ile etkin olabileceği bilinmektedir (Pitt ve Simpson 2006).

P. aeruginosa'nın direnç oranlarının son yıllardaki artışı, tedavinin antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre hastaya özel olarak planlanmasını gerektirmektedir. Günümüzde bu tür dirençli mikroorganizmalara etkili olabilecek yeni ajanların geliştirilmesine yönelik çabalar henüz başarılı olamamıştır. Polimiksinler gibi eski ve iyi bilinen ilaçların kullanımı gündeme gelmiştir. Gelecekte kullanılması muhtemel tedavi seçenekleri arasında antimikrobiyal ajanın devamlı infüzyonu ve immünoterapi yer almaktadır (Sa´nchez ve ark 2011).

1.5.1. Beta-Laktam Antibiyotikler

P.aeruginosa için önerilen beta-laktam antibiyotikler piperasilin-tazobaktam, seftazidim, aztreonam, sefepim, karbapenemler, olarak sıralanabilir (Mayer ve ark 1995). Beta-laktamlar 5 grupta toplanabilir:

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktamlar
4. Karbapenemler
5. Betalaktamaz inhibitörleridir

Beta-laktamlar bakteri hücre duvarının sentezinde seçici inhibitörler olarak görev yapar ve üreme fazındaki bakteriye karşı aktifdir. İlacın ilk etkisi hücre reseptörlerine bağlanmasıdır. *P. aeruginosa* suşlarının enzimatik (penisilinaz, GSBL, sefalosporinaz) ve nonenzimatik (pompa sistemleri, porin kaybı) mekanizmaları beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençte rol oynar (Güven ve ark 2008).

1.5.1.1. Penisilinler

*P. aeruginosa'*ya karşı etkili olan penisilinler tikarsilin, karbenisilin, azlosilin, piperasilin, beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarıdır (Jawetz ve ark 2010). *P. aeruginosa*'nın ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavunata direnç gelişimi indüklenebilir kromozamal AmpC Beta-laktamaz ve efluks pompa sistemi mekanizmaları yolu ile gerçekleşir (Gilardi 1991).

1.5.1.2. Sefalosporinler

Penisilinler gibi mikroorganizmanın PBP'lerine bağlanıp hücre duvar sentezini bozarak bakterisidal etki yapar. *P. aeruginosa'*ya etki eden üçüncü kuşak sefalosporinler başta olmak üzere, seftazidim, sefepim ve sefoperazondur (Gilardi 1991, Jawetz 2010). Seftazidimin önemli bir özelliği *P. aeruginosa*'ya karşı etki gösteren ilk sefalosporin olmasıdır. İmmün sistemi baskılanmış insanlarda görülen *P. aeruginosa* infeksiyonlarına karşı tek başına veya aminoglikozidlerle kombinasyon halinde uygulanması açısından önemlidir (Jones ve ark 1981).

1.5.1.3. Monobaktamlar

Monobaktam grubunun bilinen en önemli antimikrobiyal üyesi aztreonamdır. Yapısında beta-laktam halkasına bağlı başka bir halkaya sahip olmamasından dolayı diğer beta-laktam antibiyotiklerden ayrılır. PBP-3'üne bağlanarak hücre duvarı sentezini durdurarak bozar. Metallo-beta-laktamaz pozitif bakterinin etken olduğu infeksiyonlarda, kolistin ve aztreonam tedavide kullanılabilir (Maeda 2008,Oie 2009).

1.5.1.4. Karbapenemler

Karbapenemler diğer beta-laktamlar gibi hücre duvar sentezini inhibe ederler ve bu özelliklerini penislin bağlayıcı protein (PBP)'ler ile kovalan bağlanarak yaparlar. Geniş spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerine karşı dirençli olmaları ve indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantların seçimine meydan vermemesi karbapenemlere üstünlük

sağlamaktadır. Birinci grup karbapenemler olan ertapenem ve panipenem özellikle toplumdan kazanılmış ciddi infeksiyonların tedavisinde, ikinci grup karbapenemler (imipenem, meropenem, doripenem, biapenem) ise güçlü nonfermantatif etkinlikleri nedeniyle hastane infeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olan karbapenemler imipenem, meropenem ve doripenemdir. Meropenem etkinliği imipeneme oranla daha yüksektir. *P. aeruginosa* için meropenemin asıl hedefi penisilin bağlayan protein-3 (PBP-3)'dür (Edwards 1995, White Friedrich 1996). Karbapenem grubu antibiyotikler, güçlü beta-laktamaz indükleyicileri olduğu için diğer beta-laktamlar ile kombine edilmemelidir (Gülay 2003).

1.5.1.5. Beta- Laktamaz İnhibitörleri

Beta-laktam halkasına sahip ancak tek başlarına kullanıldıklarında antimikrobiyal etki göstermeyen kimyasal maddeler olarak bilinmektedir. Penisilin grubu antibiyotikleri hidrolizden korur (Gilardi 1991). *P.aeruginosa*'ya etkili başlıca beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü konsantrasyonları; piperasilin-tazobaktam ve tikarsilin-klavulanik asittir (Jawetz ve ark 2010).

1.5.2. Aminoglikozidler

Ribozomların protein sentezini inhibe ederek, mRNA'nın üzerinde taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına neden olur. Bu sayede işlevsiz bir protein sentezlenir. *P. aeruginosa'*ya etkili önemli aminoglikozidler; gentamisin, netilmisin, tobramisin ve amikasindir (Jawetz ve ark 2010) .

1.5.3. Kinolonlar

Konsantrasyona bağımlı olarak bakterisidal etkileri bulunmaktadır. DNA sentezini direk inhibe eden tek antimikrobiyaldir (Arda ve Ulusoy 2008). *P.aeruginosa*'ya en etkili olan kinolon siprofloksasindir. Levofloksasin ise sınırlı antibakteriyel etki göstermektedir (Drlica ve Zhao 1997, Şenol 2002).

1.6. *P. aeruginosa*'da Sık Görülen Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları

Antimikrobiyal bir ajanın üremeyi durdurucu veya öldürücü etkisine karşı koyabilen bakterinin bu yeteneği direnç olarak tanımlanmaktadır. Antibakteriyel direncin sadece antibiyotik kullanımı sonucu değil, mikroorganizmanın olumsuz çevre faktörlerine uyum sağlamak için kullandığı savunma mekanizması olarak belirtilmektedir.

Bakterinin genetik özellikleri nedeniyle bazı antibiyotiklere dirençli olması doğal (intrinsink) direnç olarak tanımlanmaktadır. Doğal direnç, mikroorganizmaların tür özelliği olarak antibiyotiğin hedeflediği yapıya sahip olmamaları veya ilacın yapısal bir özelliğinden dolayı hedefe ulaşamamasından kaynaklanır (Sanders 1992). Kazanılmış direnç ise bakterinin genetik yapısındaki değişimlere bağlı olarak, transpozon, kromozom veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlar sonucunda ya da direnç genlerinin tranformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla başka bakterilerden alınması ile ortaya çıkar (Cunha 2002). Bakterinin sahip olduğu doğal ve kazanılmış direnç mekanizmalarından dolayı tüm dünyada hızla yeni nesil ilaçlar geliştirilmekte ve direnç sonucu ortaya çıkan infeksiyonlar bildirilmektedir (Yüce 2001).

P. aeruginosa antibiyotiklere birçok mekanizma ile direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Plazmid ve kromozomal kaynaklı beta-laktamaz üretimi ile antibiyotiklerin hedeflerinde değişikliğe neden olmaktadır. Bakterinin porin proteinlerindeki değişikliğe bağlı dış membran geçirgenliğinde azalma görülmektedir. Bakteri, efluks pompa sistemini kullanarak antibiyotiğin geri dışa atılmasını sağlamaktadır (Tenover 2006). Klinikte en sık beta-laktamaz aracılığı ile olan direnç mekanizmasına rastlanmakta olup bu da beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. *P. aeruginosa* ayrıca kromozomal mutasyonlar, plazmidler, integron veya transpozonlar aracılığı ile taşınan genlerin kazanımı sonucu direnç geliştirme yeteneğine sahiptir (Gilardi 1991).

1.6.1. Aktif Pompa (Efluks) Sistemi

P. aeruginosa'nın sahip olduğu efluks pompa sistemi fonksiyonel ve yapısal olarak birbirine bağımlı 3 proteinden oluşur. Sitoplazmik membranda enerji bağımlı

pompa, dış membranda porin proteini ve bu iki membran arasındaki periplazmik aralıkta üçüncü bir protein bulunmaktadır (Tenover 2006).

P. aeruginosa'da antibiyotik direncine neden olan dört majör efluks pompa sistemi bulunur. Bu direnç sistemleri **Çizelge 1.4'**de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. *P. aeruginosa*'da bulunan efluks pompa sistemleri (Strateva ve Yordanov 2009)

Sistem	Düzenleyici Gen	Mutasyon Geni	Substratlar
mexAB-OprM	mexR	nalB ve nalC	İmipenem hariç beta-laktam antibiyotikler, kloromfenikol, eritromisin,florokinolonlar, tetrasiklin, trimetoprim, sulfonamid, novobiyosin, etidyum bromür, sodyumdodesil, sülfat, hidrokarbonlar, triklosan, irgasan, homoserin lakton.
MexCD-OprJ	nfxB	nfxB	İmipenem hariç beta-laktam antibiyotikler, kloromfenikol, eritromisin,florokinolonlar, tetrasiklin, trimetoprim, sulfonamid, akriflavin, sodyum dodesil sülfat, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexEF-OprN	mexT	nfxC	Kloromfenikol,florokinolonlar, trimetoprim, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexXY-OprM	mexZ		Aminoglikozidler, karbenisilin, seftazidim ve imipenem hariç beta-laktamlar, kloromfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, novobiyosin.

1.6.2. Dış Membran Porin Defektleri

Gram negatif bakterilerde dış membranın, doğal (intrinsik) dirence katkısı büyüktür. Bu bakterilerde küçük hidrofilik moleküller dış zardan porinler aracılığı ile geçebilir. Antibiyotiklerin porinlerden geçişi, şekli, büyüklüğü, yükü ve hidrofilik özelliklerine bağlı olarak belirlenir. Beta-laktam grubu antibiyotiklerin birçoğu hidrofilik yan zincirler içerdiğinden, porin proteinlerindeki değişimlerden kolay etkilenmektedir (Gülay 2001).

P. aeruginosa infeksiyonlarının antimikrobiyal ilaçlarla tedavisinde OprD porin proteini kaybı sonucu imipeneme direnç gelişirken meropeneme ise duyarlılıkta azalma görülmektedir. Bu durum meropenemin farklı kanallardan dış membranı geçebildiğini göstermektedir. Ayrıca OprD porin proteini kaybına bağlı

olarak karbapenem direnci gelişimi sadece kromozomal AmpC tipi beta-laktamaz üreten suşlarda görülmekte olup, bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki olduğunu düşündürmektedir (Ochs ve ark 1999).

1.6.3. Enzim üretimi

1.6.3.1. Beta-Laktamazlar

Beta-laktamazlar, kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilir ve etkilerini penisilin, sefalosporin ve benzeri beta-laktam grubu antibiyotiklerin beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak gösterir (Akalın 2003).

Beta-laktamazın tarihçesi, Abraham ve Chain tarafından 1940 yılında bir *E.coli* suşunda beta-laktam grubu bir antibiyotiği parçalayan penisilinazın gösterilmesi ile başlamıştır. Klinik tedaviye penisilinin girmesini izleyen 20-25 yıl boyunca beta-laktamazların sayı ve çeşitleri kısıtlı kalmıştır. Ancak, 1978-1980 yıllarında, klinik tedaviye toprak bakterilerince üretilen yeni beta-laktam ajanların (sefamisinler, karbapenemler, sulfonlar, monobaktamlar) girmesiyle beta-laktamaz tiplerinin de hızla arttığı gözlenmiştir (Mederios 2000).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir. Gram negatif bakterilerde beta-laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik aralıkta bulunurken, gram pozitif bakterilerde doğrudan hücre dışına salınmaktadır. Bu nedenle gram negatif bakteri türlerinde beta-laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır (Cornaglia 2000).

Üç yüzden fazla beta-laktamaz tespit edilmiş olup beta-laktamazların nükleotid ve aminoasit dizilimlerini temel alan moleküler sınıflandırması 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Günümüzde ise enzimin substrat ve inhibitör profilleri dikkate alınarak Bush tarafından yapılmış fonksiyonel bir sınıflama **Çizelge 1.5'** de mevcuttur (Strateva ve Yordanov 2009, Sacha 2008).

Çizelge 1.5. Beta-laktamazların sınıflandırılması (Sacha ve ark 2008).

Fonksiyonel Mekanizma	Ambler Sınıflaması	Bush Grup	Örnekler	Substratlar
Serin Beta-laktamazlar	Sınıf A penisilinazlar	2a, 2b, 2c	**Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar:** TEM-1, TEM-2,SHV-1	Benzilpenisilin, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler (sefazolin, sefuroksim)
		2be	**Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL):** TEM ailesi ve SHV ailesi **Diğerleri:** BES1,GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO1, TLA-1, VEB-1/2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin oksasilin TEM ve SHV ailesi ile aynı
		2br	**TEM ailesi** (TEM-30, TEM-31)	TEM ve SHV ailesi ile aynı ve inhibitörlere dirençli
		2e	**CTX ailesi**	Geniş spektrumlu betalaktamazlar ile aynı, bazı enzimler için sefepim
		2f	**Karbapenemazlar** (KPC1,KPC-2,KPC-3 ve GES-1, GES-2)	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten karbapenemler, sefamisinler
Metallo Beta-laktamazlar	Sınıf B metallo-beta-laktamaz (Çinko)	3a, 3b, 3c	**Karbapenemazlar:** IMPailesi, VIM ailesi, SPM-1,SPM-2, GIM-1 ve L-1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A ile aynı
Serin Beta-laktamazlar	Sınıf C sefalosporinaz	1	AmpC tip: AAC-1, ACT-1,CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten sefamisinler
Serin Beta-laktamazlar	Sınıf D kloksasilin hidrolize edici enzimler (OXA)	2d	**OXA ailesinin çoğu**	Geniş spektrumlu betalaktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin, oksasilin.
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 ile aynı
Bilinmeyen		4	AVS-1	Herhangi bir moleküler veya fonksiyonel gruba uymayan, sekanslanamamış ya da özellikleri tanımlanamamış enzimler

Sınıf A Beta-Laktamazlar

En geniş ve mekanik olarak en iyi şekilde karakterize edilmiş beta-laktamaz sınıfıdır. Tarihsel olarak bu beta-laktamazlar penisilin hidrolizi dolayısı ile "penisilinazlar" olarak bilinmektedir. Katalitik olarak da yüksek bir aktiviteye sahiptir ve geniş bir substrat aralığına sahiptir. Sınıf A beta-laktamazları düşük moleküler ağırlığına sahip olan Sınıf C ile yakından ilişkilidir. Sınıf A beta-laktamazların üç alt sınıfı bulunmaktadır: TEM/SHV, *P. aeruginosa* PER/OXA/TOHO sefaloporinazları ve CTX-M (NMC-A) karbapenemaz alt sınıflarıdır. 2004 yılında 135 TEM ve 57 SHV beta-laktamaz varyantları bilinmekteydi. Birkaç sınıf A varyantları klavulanat ve sulbaktam gibi inhibitörlerin inaktivasyonuna karşı direnmektedir. Ayrıca yeni sınıfA beta-laktamazları da son zamanlardaki seftazidim, sefotaksim, monobaktam ve aztreonamlar gibi sefaloporinlere karşı oldukça aktiftir. Sınıf A'nın ayrıca üç ayrı ilişkili sınıfı bulunmaktadır. Bunlar: TEM ve SHV-ESB varyantlarıdır. Bu varyantlar genellikle *Pseudomonas* başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* sınıfı içerisinde yaygındır ve nozokomiyal patojenler arasında sık olarak gözlenmektedir (Zhao ve Hu 2010).

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

Grup 2b'de yer alan ve penisilin türevleri ile dar spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre substrat profilleri genişleyerek 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimler, Bush grup 2be'de yer almaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten suşlarla oluşan infeksiyonlarda klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri kullanılabilmektedir. GSBL üreten suşlara sefamisin ve karbapenemler etkilidir (Strateva ve Yordanov 2009). Hastaneler, sıklıkla kullanılan invaziv tanı ve tedavi uygulamaları, yüksek antibiyotik kullanım oranları gibi nedenlerle dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması için uygun ortamlardır. Bu nedenle son yıllarda GSBL üretimine bağlı mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların tedavisinde önemli sorunlar yaşanmaktadır.

Klinikte *P. aeruginosa* izolatlarında GSBL varlığı 1990 yılından sonra saptanmaya başlamıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinde iyi tanımlanmış olan TEM ve SHV tipi enzimlerin dışında, *P.aeruginosa'* da başka enzimler de tanımlanmıştır.

Bunlar; PER (çoğunlukla Türkiye'den), VEB (Güneydoğu Asya, Fransa ve Bulgaristan), GES/IBC (Fransa, Yunanistan ve Güney Asya) ve BEL enzimleridir. Bu enzimlerin hidrolize edici etkileri birbirlerine benzer olsa da, genetik düzeydeki benzerlikleri düşüktür (Strateva ve Yordanov 2009).

Sınıf B Metallo Beta-Laktamazlar

Sınıf B olarak isimlendirilen metallo-beta-laktamazlar (MBL), ilk olarak 1967 yılında Kawabata ve Abraham tarafından *Bacillus cereus*'un kromozomal enzimi olarak tanımlanmıştır (Nordman ve Guibert 1998).

Metallo-beta-laktamazlar, enzim aktivitesi için kofaktör olarak işlev gören çinko iyonuna sahip beta-laktamaz grubuna aittir. Bunlar sadece karbapenemleri değil aynı zamanda beta-laktam antibiyotikleri de güçlü hidroliz etme aktivitesine sahiptir (Varaiya 2008). Ancak MBL aktivitesi, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi çoğu beta-laktamaz inhibitörleri ile hidrolize edilebilmektedir (Hirakata ve ark2003). Özellikle *P. aeruginosa* olmak üzere Gram negatif bakterilerin MBL üretimi, nozokomiyal infeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Metallo-beta-laktamaz neredeyse bütün serin beta-laktamaz inhibitörlerini hidroliz etmektedir. Bunun sebebi ilk olarak IMP, VIM ve SMP sınıf genlerinin integronlar tarafından taşınmasıdır, ikincisi ise bu enzim varyantlarının substratlarını hemen değiştirebilmeleridir ve özelliklerini de genellikle tek nokta mutasyonu veya aktif bölgelerini değiştirerek başarmaktadır (Bush ve Jaboby 2010).

Son yıllarda MBL genleri *P. aeruginosa*'dan *Enterobacteriaceae* familyasına kadar yayılım göstermiştir. Dolayısı ile Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu antibiyotik direncinin artmasındaki neden, MBL genlerinin bakteriler arasında yayılmasının sonucudur. Bu genler; tüm beta-laktam sınıflarını hidroliz eden beta-laktamaz inhibitörleri ile nötralize olmayan enzimleri kodlamaktadır. MBL genleri genellikle aminoglikozid direnç genleri ile ilişkilidir ve dolayısı ile bakteriler aminoglikozidler ile birlikte direnç gösteren MBL genlerine sahiptir. Bu genler integronlar aracılığı ile taşınan gen kasetlerinde bulunmaktadır (Walsh ve ark 2005).

Sınıf C Beta-Laktamazlar

Sınıf C beta-laktamazlar, sınıf A beta-laktamazlar ile beta-laktam hidrolizi için aktif bölgelerinde asetilasyon ve hidrolitik deasetilasyon mekanizmalarını paylaşmaktadır. Sınıf C beta-laktamazlar orijin olarak sefaloporinazlar olarak bilinir çünkü substrat tercihleri sefaloporinlerdir. Genellikle gram negatif bakterilerde bulunur ve *Citrobacter freundii*, *Entrerobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloaceae'*nin dahil olduğu birkaç organizmada kromozomal olarak kodlanmaktadır. Sınıf C beta-laktamazların plazmid tarafından kodlama sıklığındaki artış ilk keşfinden 15 yıl sonra gözlenmiştir. Plazmid tarafından kodlanan sınıf C enzimleri *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp*., *C. freundii*, *E.aerogenes* ve *Proteus mirabilis*'de bulunmuştur. Üçüncü kuşak sefalosporinler son 10 yıldır sınıf C beta-laktamazların inhibisyonu için kullanılmaktadır. Fakat sınıf C beta-laktamazların çoğu üçüncü kuşak sefaloporinleri hidroliz etme yeteneğindedir (Bush ve Jaboby 2010).

Sınıf D Beta-Laktamazlar

Bu beta-laktamazlar, oksasilini hidroliz etme yeteneklerinde dolayı OXA-beta-laktamazlar olarak adlandırılır. Şu anda bilinen 50 sınıf OXA varyantı bulunmaktadır. Sınıf D enzimler büyük ölçüde *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella sp., K.pnemoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'nin de içinde bulunduğu Gram negatif patojenlerde bulunmaktadır. Şu anda OXA beta-laktamazların klinik etkisi *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* ile ilişkili olmasına rağmen, bu durum çoğu gram negatif bakterileri de kapsamaktadır (Zhao ve Hu 2010).

1.6.3.2. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler

Pseudomonas'larda aminoglikozid direnci ile ilgili çeşitli direnç mekanizmaları saptanmıştır. En önemli mekanizma bakteriyel aminoglikozid fosfotransferaz, aminoglikozid asetiltransferaz, aminoglikozid adeniltransferaz enzimleri ile aminoglikozidlerin modifikasyonudur (Poole 2003, Strateva ve Yordanov 2009).

1.7. Mutasyona Bağlı Direnç

P. aeruginosa'da kinolon direncine iki önemli mekanizma yol açar. İlk mekanizma enzimler üzerindeki yapısal değişikliklerdir. DNA giraz (Topoizomeraz II) enzimindeki aktif bölgeyi kodlayan *gyrA/gyrB* genlerinde oluşan nokta mutasyonlar sonucunda enzimin A ve B subünitlerinin aminoasit dizilimleri değişerek, enzimin kinolonlara olan affinitesi azalır. Kinolonların diğer hedefi olan topoizomeraz IV enzimini kodlayan *parE* ve *parC* genlerindeki nokta mutasyonlar da dirence yol açmaktadır (Hooper 1998, Strateva ve Yordanov 2009).

1.8. Biyofilm

1.8.1. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı

Biyofilm kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi diş yüzeyindeki plaklardan aldığı örneklerin mikroskop ile incelemesi sonucu tespit ettiği mikrobiyal kümelerin varlığı ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar bu konu hakkında bir çalışma yapılmamasına karşılık biyofilmle ilgili teori 1978'den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır (Costerton ve ark 1978).

Biyofilm, inert veya canlı bir yüzeye yapışarak yapısal bütünlüklerini koruyan, toplu halde yaşayan ve birbirleriyle sinyaller yoluyla iletişim kurarak yaşamlarını devam ettiren bakterilerin oluşturduğu kompleks yapıda bir oluşumdur (Çiftçi 2005). Bakteriler, ekstraselüler polimerik maddeler olarak bilinen ve bir dizi polisakkarit, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunur. Fosil kayıtları, 3 milyar yıldan uzun bir süredir prokaryotların biyofilmler içinde yaşadığını ortaya çıkarmıştır (Donlan ve Casterton 2002).

Biyofilmler canlı ya da cansız yüzeylerde oluşabilmektedir. Canlı olan doku yüzeylerinde, endüstriyel veya içme sularında, su sistemlerinin borularında, medikal implantlar ve protezler üzerinde biyofilm oluşabilmektedir. Biyofilm matriksinin

yapısında hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, çamur benzeri parçalar veya kan bileşenleri bulunabilir (Donlan ve Casterton 2002).

Biyofilmler sadece yüzeye yapışmış ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu bir tabakadan ibaret değildir. Biyofilm temel olarak mikroorganizma ve ekstraselüler polimerik substanstan (EPS) oluşur. Ekstraselüler matriks içinde bulunan bakterilerin belirli bir yapıya sahip ve fonksiyonel olarak koordinasyon yeteneklerinin bulunduğu biyolojik sistemlere sahip olduğu ortaya konmuştur. Matriks içerisindeki hücrelere oksijen ve esansiyel besinlerin taşınmasında görevli, çok tabakalı heterojen yapıda su kanalları bulunmaktadır (Donlan ve Casterton 2002).

Gram negatif bakterilerin matrikslerinin nötral veya polianyonik yapıda biyofilmler oluşturduğu, Gram pozitif bakterilerin katyonik yapıda matriksler oluşturduğu bilinmektedir (Çiftçi 2005).

Biyofilmlerin büyük bir kısmını (%73-98) su oluşturmaktadır. Biyofilmin yapısı ve görünümü mikroskobik olarak incelendiğinde, içlerinden kanalların geçtiği mantar veya piramit şekilli uzantıların olduğu bir oluşum şeklinde görünmektedir. Biyofilmin bu kompleks yapısı, ortamda bulunan organik ve inorganik moleküllerin ekstraselüler yapıda toplanmasıyla oluşur (Sakarya 2005).

1.8.2. Biyofilmin Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bakteri bir yüzey ile karşılaştığında bir dizi genetik olarak belirlenen süreç sonucunda biyofilm oluşumunu gerçekleştirir. Biyofilmin oluşum döngüsü tutunma, bağlanma, ilk ve ikinci olgunlaşma fazı, ayrılma olmak üzere beş aşamada gerçekleşmektedir (Post ve ark 2004).

a) Tutunma Basamağı: Mikroorganizmanın, yüzeye organik veya inorganik maddelerin yapışmasının ardından bu yüzeye geri dönüşür (reversible) özellikte tutunur. Bakteri hareketleri ve bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır (Altun ve Şener 2008).

b) Geri Dönüşümsüz Bağlanma Basamağı: Bu basamak ilk tutunmadan dakikalar sonra meydana gelir. Bakterinin yüzeye tutunmasının ardından, bakteriler kendi aralarında iletişim sağlayan kimyasal sinyalleri algılayarak çoğalmaya başlar. Belirli bir sinyal seviyesine ulaşıldığında ekzopolisakkarit üretimini sağlayan genetik mekanizma aktif hale geçer. Bunun ardından bakteri çoğalarak ekstraselüler matriks (ECM) sentezine başlar. Ekstraselüler matriks hem mikroorganizmayı bir kütle içinde tutarak yüzeye tutunmasını sağlar, hem de biyofilm ilişkili antimikrobiyal direnç gelişimine neden olur (Petersen ve ark 2005).

c) İlk ve İkinci Olgunlaşma Fazı: Yüzeye tutunan bakterilerin bölünerek çoğalması ilk olgunlaşma fazı olarak bilinir. Biyofilmlerin 100 µm'den fazla kalınlığa ulaşması ikinci olgunlaşma fazı hücreleri olarak adlandırılır. Olgunlaşan biyofilmler oksijen konsantrasyonu, pH değişimi, besin varlığı, metabolik olaylar, üreme gibi çeşitli faktörlere göre değişim gösteren heterojenik mikroçevreler içerir (Kaplan 2010).

d) Ayrılma Basamağı: Son aşama olan ayrılma basamağında, biyofilm hücreleri koparak ayrılır ve çevreye dağılır. Koparak ayrılan mikrokoloniler hareket yetenekleri sayesinde ortamda infekte olmamış bölgelere giderek tutunur ve yeni biyofilm oluşumunu gerçekleştirir (Karatan ve Watnick 2009).

1.8.3. Biyofilm Oluşumunun Önemi

Bakterilerin serbest formdan biyofilm formuna geçişlerinin dört temel sebebi vardır (Koluman ve ark 2006).

1. Savunma: Mikroorganizmanın kendilerine daha korunaklı bir ortam oluşturma gereksinimi sonucunda savunma, korunma ve strese cevap amaçlı biyofilm oluşturmaktadır (Costerton ve ark 1999).

2. Adezyon ve Kolonizasyon: Bakterinin besin yönünden zengin, su, oksijen ve sabit sıcaklığı olan bir bölgede yaşama şansı yüksek olacağından bu faktörlerin bulunduğu ortamda sabit bir yapı oluşturma isteğinden dolayı biyofilm oluşturur (Sakarya 2005).

3. Yaşanabilir çevre geliştirme: Ortamdaki glikozun bakteriler tarafından kullanılabilir olması, bakterilerin ekzopolisakkarit ekspresyonu ve biyofilm yapımını arttırmakta ve kendilerine yaşanabilir bir çevre oluşturmaktadır (Ammendolia ve ark 1999).

4. Topluluk oluşturmak: Bakterilerin ortama adapte olarak beraberliklerini devam ettirebilmeleri biyofilm oluşumu için önemlidir. Bu uyum, ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Biyofilm içindeki tüm bakterilerin çevre şartlarına aynı yanıtı vererek fenotipik değişimler sergilemeleri topluluk oluşturarak yaşamalarının göstergesidir (Sakarya 2005).

1.8.4. Tıbbi İnfeksiyonlar ve Biyofilm İlişkisi

Hastane kaynaklı infeksiyonların %60'ından fazlasında bakteri-biyofilm ilişkisi gösterilmiştir. Biyofilm, antibiyotiklere ve fagositoza karşı dirence neden olmaktadır. Biyofilm oluşumu özellikle *P. aeruginosa* infeksiyonlarında sıklıkla karşılaşılmaktadır (Fonseca ve Sousa 2007). Bakterinin biyofilm oluşturma yeteneği bakteriler arasında plazmidler aracılığı ile aktarılmaktadır (Delissalde ve Amabile 2004).

Biyofilm oluşturan bakteriler ile üriner katater, protez kapak, santral venöz katater, kontakt lens ve rahim içi araç (RİA) gibi yabancı cisim infeksiyonları ile birlikte otitis media, doğal kapak endokarditi, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar arasında epidemiyolojik olarak bağlantısı olduğu kanıtlanmıştır (Wagner ve Iglewski 2008).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2013-2015 yılları arasında çeşitli klinik ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen farklı klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşları çalışmaya alındı. Kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 278553 ve *E.coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı. Hastaların aynı dönemde birden fazla kültür örneği varsa yalnızca ilk izole edilen *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edildi.

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'undan 16.12.2014 tarih ve 2014/21 sayılı karar ile izin alınmıştır.

2.1. Bakterilerin Tanımı ve İzolasyonu

Laboratuvara gelen örnekler ilk olarak %5'lik koyun kanlı agar ve EMB (Eozin Metilen Blue) agara ekildi. Ekimi yapılan plaklar 24-48 saat süre ile 36±1ºC'de inkübe edildi. Aerop koşullarda üreyen, kanlı agarda beta hemoliz yapan ve karakteristik olarak aromatik bir kokuya sahip olan kolonilere Gram boyama yapıldı. Daha sonra Gram negatif basil morfolojisindeki bakterilerin tanımlamaları biyokimyasal özelliklerine göre yapıldı. Laktoz negatif, oksidaz pozitif ve katalaz pozitifliğe sahip bakterilere *Pseudomonas* ön tanısı konuldu. Bakterinin tür düzeyinde tanımlanması için Vitek 2 otomatize sistemi (BioMerieux, Fransa) kullanıldı ve *P.aeruginosa* olarak tanımlanan suşlar çalışmaya alındı.

P.aeruginosa olarak tanımlanan suşlar çalışılıncaya kadar saklamak amacı ile, cryobank (Mastdiagnostics, İngiltere) boncuklu tüplere alınarak -20ºC'de stoklandı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

% 5'lik İnsan Kanlı Agar: Ticari kit olarak temin edilen blood agar base'den (BioMerieux, Fransa) 40 gr tartılarak 1 litre distile su içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Besiyeri sıcaklığı 45-50°C ye düştükten sonra %5 steril defibrine insan kanı

ilave edildi. Karıştırılarak homojenizasyon sağlandıktan sonra steril plaklara döküldü. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

İçeriği (g/ l):

Lab-lemco powder	10 g
Pepton	10 g
Sodium chloride	5 g
Agar	15 g
pH	7,3±0,2 g

Mueller Hinton Agar: Bu besiyeri Or-bak (Türkiye) firmasından hazır olarak temin edildi. Besiyerinin içeriği aşağıdaki gibidir. Mueller-Hinton Agar (MHA), antibiyotik duyarlılık testleri, İBL ve MBL üretimi için kullanıldı.

İçeriği (g/ l):

Beef extract Casein	2 g
Hidrolisate-asidic	17,5 g
Agar	17 g
Nişasta	1.5 g
pH	7.3±0,1 40g

Luria Broth (Miller's LB Broth): Ticari kit olarak temin edildi(Merck, Almanya). Biyofilm oluşumunda subkültür için kullanıldı.

İçeriği (g/ l):

Tripton	10 gr
Sodyum Klorür	10 gr
Maya özü	5 gr
pH	7,0 ±0,2

Fosfat Buffer Salin: Ticari kit olarak temin edildi (Merck, Almanya).

İçeriği (g/ l):

Dipotasyum Hidrojen Fosfat	1,1 g

Potasyum Dihidrojen Fosfat	0,32 g
Sodyum Klorür	8,5 g
pH	7,2 ± 0,1

Oksidaz Testi: 0,1 g tetramethyl-p-phenylenediamine dihidroklorür 10 ml distile suda çözüldü. Daha sonra ışık geçirmeyen kahverengi kapaklı cam şişelere konuldu ve kullanılıncaya kadar +4ºC'de saklandı. Filtre kâğıtları temiz bir lamın üzerine alındı ve üzerine 2-3 damla oksidaz ayıracı damlatıldı. Şüpheli koloniden öze ile alınan örnek filtre kağıdında ayıracın bulunduğu yere sürüldü. 15 saniye içerisinde mavi-mor renk görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Katalaz Testi: Hidrojen peroksit (H_2O_2) %3'lük konsantrasyonu hazırlandı ve kapaklı cam şişede +4 ^oC'de saklandı. Bir lam üzerine bir iki damla H_2O_2 damlatıldı ve kuşkulu koloni öze ile alınarak karıştırıldı. Hava kabarcığı oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Hava kabarcığının oluşmaması veya 20 saniyeden sonra oluşması negatif olarak değerlendirildi

2.3. İndüklenebilir Beta-laktamaz Üretiminin Araştırılması

İndüklenebilir beta-laktamaz testi disk indüksiyon yöntemi ile yapıldı. Saklamaya aldığımız -20°C stoktaki *P.aeruginosa* suşları canlandırıldı. 36°C'de 18-24 saat inkübe edilerek saf ve taze kültürler elde edildi. *P.aeruginosa* kolonilerinden alınarak hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonlar Mueller Hinton Agar (MHA) (Or-bak, Türkiye) besiyerinin yüzeyine yayıldı, 15 dakika oda derecesinde bekletildikten sonra plağın orta kısmına güçlü beta-laktam indükleyicisi olan imipenem (10µg), 20mm uzağına aztreonam (30µg), seftazidim (30 µg) diskleri (Bioanalyse, Ankara) yerleştirildi. 18-24 saat 36°C'de etüvde inkübe edildi. İmipenem diskine bakan kısımlarda, inhibisyon zon çaplarında daralma görülmesi İBL pozitifliği olarak kabul edildi.

2.4. Metallo-beta-laktamaz Üretiminin Araştırılması

Metallo-beta-laktamaz üretimi Modifiye Hodge testi ve imipenem/imipenem+EDTA G-Test yöntemi ile araştırıldı.

Modifiye Hodge ve IMP/IMP+EDTA G-Test yöntemlerinin birbirleriyle uyumu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Uyum (%) : a+b/c x100

2.4.1. Modifiye Hodge Testi

E.coli ATCC 25922 standart suşu ile kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanarak MHA plaklarına yayıldı. Plaklar 15 dakika oda derecesinde kurumaya bırakıldıktan sonra merkeze IMP diski yerleştirildi. Farklı üç *P.aeruginosa* suşları karşılıklı olacak şekilde, merkezden perifere doğru çizgi ekim yapıldı ve 36ºC'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra IMP diskinin oluşturduğu inhibisyon zon çapında görülen yonca yaprağı şeklinde bir daralma ve bu bölgede *E.coli* üremesi MBL pozitifliği olarak kabul edildi. *P.aeruginosa* ATCC 27853 kontrol suşu olarak kullanıldı.

2.4.2. İmipenem/İmipenem +EDTA G-Test

P.aeruginosa kökenlerinde MBL varlığının araştırılması için Modifiye Hodge test ile birlikte G-Test yöntemi de kullanıldı. *P.aeruginosa* izolatlarından alınan koloniler 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak MHA plaklarına yayma ekim yapıldı. Oda derecesinde 15 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra üzerlerine bir tarafı imipenem (IMP) (0,125-8 mg/L), diğer tarafı imipenem+EDTA (0,032-2 mg/L) içeren G-Test (Liofilchem, İtalya) şeritleri yerleştirildi. 36ºC'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra MİK değerleri belirlendi. $MİK_{IMP}/MİK_{IMP+EDTA}$ değeri ≥8 ya da fantom zonu görülmüş ise izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P.aeruginosa* ATCC 27853 kontrol suşu olarak kullanıldı.

2.5. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

P.aeruginosa suşları Luria Broth (LB) besiyerinde üç gün arka arkaya üç defa subkültüre edildi. Daha sonra üçüncü subkültürü yapılan örneklerin absorbansı spektrofotometrede (S-22 UV/Vis. Cihazı BOECO-Almanya) 540 nm'de 0,56-0,64 olacak şekilde ayarlandı. Absorbansı ayarlanan örneklerin 200 mikrolitresi 96 kuyucuklu mikropleyte aktarıldı ve kontrol kuyucuğuna bakterisiz LB besiyeri

konuldu. Mikropleyt daha sonra 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa 25 µL kristal viyole eklendi. Mikropleyt çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletildi. İçindeki besiyeri çıkarıldıktan sonra kuyucuklar otomatik yıkama cihazında (BİOTEK-ABD ELx 50) fosfat buffer salin (PBS) ile 3 kere yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 200 µL %96'lık etanol eklendi. 590 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü (BİOTEK-ABD ELx800). Bakterili kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinden kontrol kuyucuğundan elde edilen değer çıkarıldı. Elde edilen değer 0,1'in üstünde ise pozitif, 0,1'in altında ise negatif olarak kabul edildi (Fertas-Aissani ve ark 2012).

Örneğe ait absorbans- Kontrol kuyucuğu (LB broth) absorbans = 0,1> POZİTİF
Örneğe ait absorbans- Kontrol kuyucuğu (LB broth) absorbans = <0,1 NEGATİF

2.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Baurer disk difüzyon yöntemi ile The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına uygun olarak yapıldı (EUCAST 2015). Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve disk içerikleri **Çizelge 2.1.**'de gösterildi.

Saklamaya alınan -20°C stoktaki *P.aeruginosa* suşları pasaj yaparak canlandırıldı. *P.aeruginosa* kolonilerinden 0,5 McFarland bakteri süspansiyonları hazırlandı ve MHA plaklarına ekimi yapıldı. 15 dakikalık süre içinde antibiyotik diskleri 20 mm aralıklarla plaklara yerleştirildi. Plaklar 18-20 saat 35°C'lik etüvde inkübe edildi. Tam inhibisyonun gözlendiği alanın çapı cetvel kullanılarak petri kabının tersinden ölçüldü ve EUCAST'ın önerdiği sınırlara göre ölçülen zon çapları duyarlı (S), orta duyarlı ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (EUCAST 2015). Orta duyarlı bulunan suşlar dirençli olarak kabul edildi. Standart suş olarak *P.aeuginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.

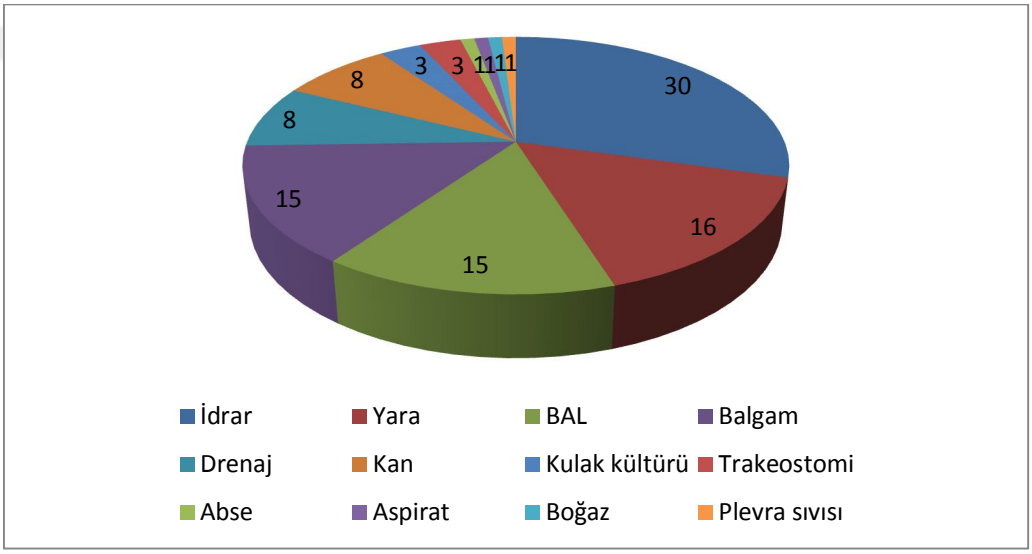
Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullanılan antibiyotik disk ve içerikleri.

Antibiyotik Diskleri (Bioanalyse)	Antibiyotik Dozları
Meropenem (MEM)	**10 µg**
İmipenem (IPM)	**10 µg**
Seftazidim (CAZ)	**10 µg**
Sefepim (FEP)	**30 µg**
Aztreonam (ATM)	**30 µg**
Gentamisin (CN)	**10 µg**
Tobramisin (TOB)	**10 µg**
Amikasin (AK)	**30 µg**
Piperasillin /tazobaktam (TZP)	**30/6 µg**
Levofloxacin (LEV)	**5µg**

3.BULGULAR

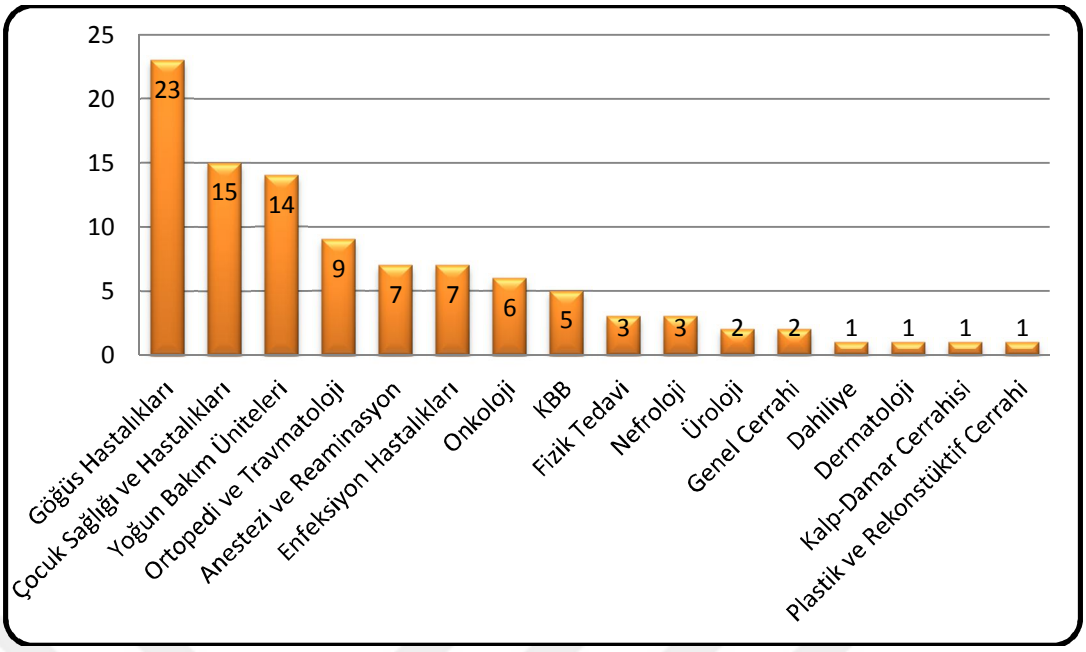
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çeşitli kliniklerden gelen örneklerde üreyen toplam 100 *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 100 suşun 30'u idrardan, 16'sı yaradan, 15'i BAL ve balgamdan, , 8'i drenajdan, 8'i kandan, 3'ü abse, aspirat, boğaz ve cilt sürüntüsü örneklerinden izole edilmiştir. Suşların klinik örneklere göre dağılımı **Şekil 3.1** gösterilmiştir.



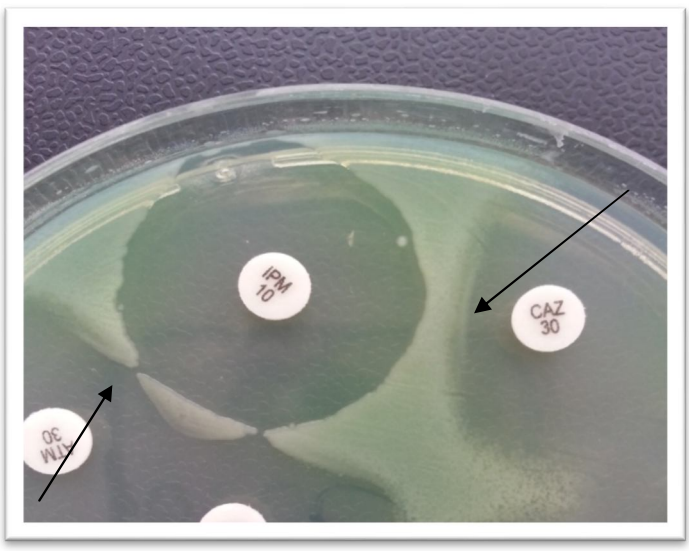
Şekil 3. 1. İzole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinin klinik örneklere göre dağılımı.

Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşları en fazla Göğüs Hastalıkları Kliniği'nden (%23), ikinci sırada da Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nden (%15), izole edilmiştir. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı **Şekil 3.2.** gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının kliniklere göre dağılımı.

P.aeruginosa izolatlarında İBL varlığı disk indüksiyon yöntemiyle, suşların 89'unda (%89) pozitif, 11'inde (%11) negatif olarak saptanmıştır (**Şekil 3.3**).



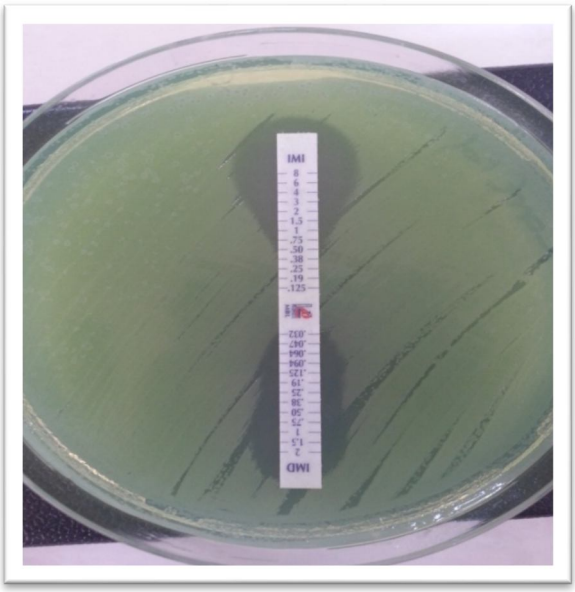
Şekil 3. 3. *P.aeruginosa* suşunda İBL pozitif suş (Çalışmamızdan)**.**

Modifiye Hodge Test yöntemi ile 100 *P.aeruginosa* suşunun 20'sinde (%20) MBL üretimi pozitif olarak saptanmıştır. IMP/IMP+EDTA G Test yöntemi ile

17’sinin (%17) MBL üretimi pozitif olarak belirlenmiştir Çalışmamızdaki Modifiye Hodge ve G Test yöntemleri **Şekil 3.4**. ve **Şekil 3.5.**’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Modifiye Hodge Test yöntemi (Çalışmamızdan).



Şekil 3. 5. IMP/IMP+EDTA G-Test MBL üretimi pozitif suş (Çalışmamızdan).

Modifiye Hodge ve IMP/IMP+EDTA G-Test yöntemlerinin birbirleriyle uyumu aşağıdaki **Çizelge 3.1** gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Modifiye Hodge ve G-Test bulgularının dağılımı.

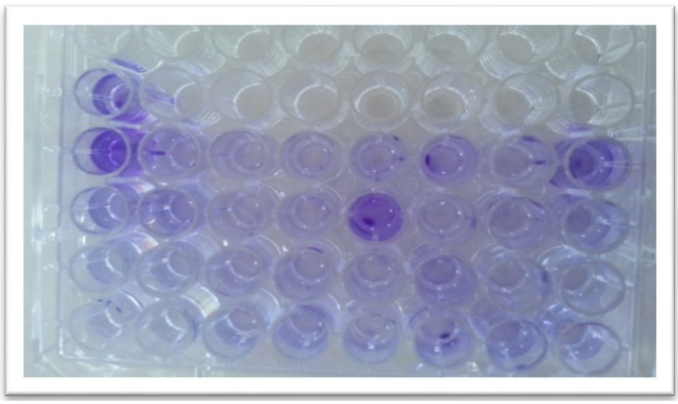
MBL		**İmipenem/İmipenem+EDTA G Test**		**Toplam**
		Pozitif	Negatif	
ModifiyeHodge Test	Pozitif	9	11	20
	Negatif	8	72	80
Toplam		17	83	100

Buna göre; IMP/EDTA G-Test ile Modifiye Hodge testinin birbiriyle uyumu %81 olarak belirlenmiştir.

Uyum (%) : a+b/c x100

a: Her iki test ile pozitif sonuç veren izolat sayısı: 9
b: Her iki test ile negatif sonuç veren izolat sayısı: 72
c: Toplam izolat sayısı: 100

P.aeruginosa suşlarının 8'inin biyofilm yaptığı, 92'sinin negatif olduğu belirlenmiştir. MBL üretimi ile biyofilm oluşumu arasında yapılan incelemede; Modifiye Hodge Test ve IMP/IMP+EDTA G-Test yöntemlerinin her ikisinde de MBL pozitif sonuç veren 9 suşun 4'ünün (%44,4) biyofilm oluşumu pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki mikroplate yöntemi **Şekil 3.6.**'da gösterilmiştir.

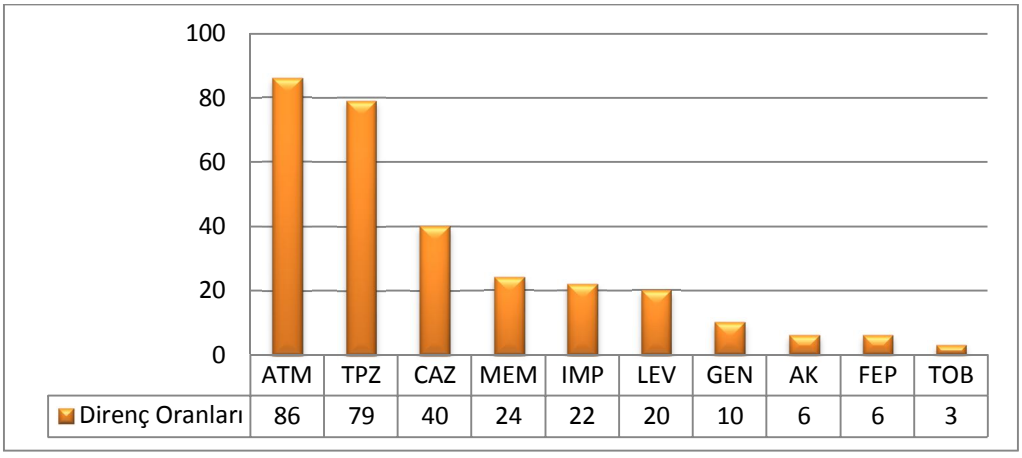


Şekil 3.6. Mikroplate yönteminde biyofilm oluşumu. (Çalışmamızdan).

Disk difüzyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde kökenlerin en dirençli olduğu antibiyotikler **(Çizelge 3.2.)** sırasıyla aztreonam %86, piperasilin/tazmobaktam %48, seftazidim %40, meropenem %24, imipenem %22, levofloksasin %20, gentamisin %10, amikasin %6, sefepim %6, tobramisin %3 olarak belirlenmiştir (**Şekil 3.7**).

Çizelge 3.2. 100 *P.aeruginosa* suşunun antimikrobiyallere dirençlilikleri.

Antibiyotikler	Dirençli suş sayısı	(%)
Aztreonam	86	(86)
Piperasilin/tazobaktam	48	(48)
Seftazidim	40	(40)
Meropenem	24	(24)
İmipenem	22	(22)
Levoflaksasin	20	(20)
Gentamisin	10	(10)
Amikasin	6	(6)
Sefepim	6	(6)
Tobramisin	3	(3)



Şekil 3. 7. *P.aeruginosa izolatlarının* antibiyotiklere dirençlilik oranları.

P.aeruginosa suşlarında en çok dirençlilik gösteren antibiyotikler aztreonam, piperasilin/tazobaktam ve seftazidim olarak saptanmıştır. Bu antibiyotiklere dirençli suşların İBL, MBL varlığı ve biyofilm oluşumlarının dağılımı **Çizelge 3.3.** gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. *P.aeruginosa* suşlarında en dirençli antimikrobiyallerin İBL, MBL varlığı ve biyofilm oluşum yüzdelerinin dağılımı.

Antibiyotikler	İBL (n:89)		MBL				Biyofilm (n:8)	
			Modifiye Hodge (n:20)		İmipenem/İmipenem +EDTA ETest (n:17)			
	Pozitif Suş sayısı	(%)	Pozitif Suş sayısı	(%)	Pozitif Suş sayısı	(%)	Pozitif Suş sayısı	(%)
Aztreonam (86)	77	(89,5)	17	(19,7)	14	(16,2)	6	(6,9)
Piperasilin/tazobaktam (48)	38	(79,1)	7	(14,5)	8	(16,6)	5	(10,4)
Seftazidim (40)	31	(77,5)	7	(17,5)	9	(22,5)	4	(10)

4.TARTIŞMA

Gram negatif bakteriler içinde fırsatçı infeksiyon ajanı olan *P.aeruginosa*, özellikle hastanelerde pnömoni, yara infeksiyonları, üriner infeksiyon, septisemilere neden olan nonfermentatif bir bakteridir. Özellikle hastane infeksiyonlarında birçok antibiyotiğe karşı hızla geliştirdikleri direnç ile günümüzde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Yücel ve ark 2006). *P.aeruginosa*, hastane infeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (Gül ve ark 2004). Avrupa'da 17 ülkenin katıldığı Europen Prevalence Infection in Intensive Care (EPIC) sonuç raporunda en sık nozokomiyal infeksiyon etkeni *Enterobacteriaceae* ailesi, ikincisi *Staphylococcus aureus*, üçüncü sırada ise *P.aeruginosa* olduğu belirtilmiştir (Vincent ve ark 1995). EPIC 2009'da 75 ülkede yapılan benzer çalışma da, verilerin bir önceki çalışmayla uyumluluk gösterdiğini teyit etmiştir (Vincent ve ark 2009). Karakoç ve ark (2013), bakteremide mortalite risk faktörlerini araştırdıkları bir çalışmada en sık izole edilen infeksiyon etkenlerini *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P.aeruginosa* olarak bildirmişlerdir.

Gram negatif bakterilerde İBL üretimi bu bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde de önemli problemlere yol açmaktadır. Bu enzimi üreten bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılan beta-laktam antibiyotiklere tedavi sırasında direnç geliştiği gözlenmekte olup, çoklu ilaç direnci ile sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu dirençli kökenler özellikle hastane ortamında hızla yayılmakta ve önemli bir nozokomiyal patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle de İBL sentezleyen *P.aeruginosa* türleri hastanelerde yoğun bakım üniteleri, kistik fibroz merkezleri ve yanık ünitelerinde yatan hastalar arasında ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır (Sanders ve Sanders 1987).

P.aeruginosa'nın beta-laktamaz üretimine bağlı direnç oranları, antibiyotik kullanım özelliklerine bağlı olarak ülkeler arasında hatta her ülkenin bölgelerine ve her bölgenin çeşitli hastanelerine göre farklılıklar göstermektedir.

Wolska ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen 20 *P.aeruginosa* suşunda indüklenebilir beta-laktamaz pozitiflik varlığını çift disk yöntemi ile araştırmış ve pozitiflik oranı %72 bulunmuştur. Ayrıca 2008 yılında

yaptıkları benzer çalışmada bu oranı %98,5 olarak tespit etmişlerdir (Wolska ve ark 2008). Dunne ve Hardin (2005) hastane infeksiyon etkeni olan 134 *P.aeruginosa* suşunda %85,8 oranında İBL pozitifliği saptamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise; Oldacay ve ark (2003) hastane infeksiyon etkeni olan 50 *P.aeruginosa* suşunun %60'ında İBL varlığına rastlamışlardır. Çelik ve ark (2007) hastane infeksiyonu tanısı almış hastalardan izole ettikleri 50 *P.aeruginosa* izolatının İBL varlığını direkt indüksiyon yöntemiyle incelemişler ve %82 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Ekşi ve ark (2007) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 51 suşun %52,9'unda İBL pozitifliği saptamışlardır. Güler ve ark (2008) klinik örneklerden izole ettikleri hastane infeksiyon etkeni Gram negatif bakterilerin beta-laktamaz aktivitelerini araştırmışlar ve 332 *P.aeruginosa* suşunda %18,4 pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir. Berktaş ve ark (2011) hastane infeksiyonu etkeni 87 izolatın %74'ünde İBL üretimi olduğunu tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda *P.aeruginosa* suşunun %89'unda İBL pozitifliği görülmüş ve diğer çalışmalarla uyumlu aralıkta olduğu saptanmıştır. Literatürlerde görüldüğü gibi İBL pozitif *P.aeruginosa* suşlarında farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu farklılık incelenen suş sayılarına, testleri değerlendirme dikkatine ve yıllar içerisinde bakterilerde ortaya çıkan genetik mutasyonlar gibi pek çok etmene bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Karbapenem hidrolize eden beta-laktamazların dünya çapında yayılmasının yakın gelecekte antibiyotik etkinliği için önemli bir tehdit olacağı düşünülmektedir (Poirel ve Nordmann 2002). Karbapenemazlar içinde en sık saptanan enzimler MBL'lerdir. MBL'ler özellikle *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ve son yıllarda da *Enterobacteriaceae* üyelerinde olmak üzere bütün dünyada yaygın olarak izole edilmektedir. Karbapenemlerin yanı sıra çoğu beta laktam antibiyotiği de hidroliz edebilme kapasitelerinden dolayı MBL'leri üreten bakteriler söz konusu olduğunda beta-laktam antibiyotiklerin kullanılabilirliği ciddi olarak sınırlanmış durumdadır.

Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerdeki direncin yayılımı aynı genotip içerisinde klonal bir şekilde olabildiği gibi bakteriden bakteriye gen transferi ile de olabilir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda, İtalya, Yunanistan, Kore, Çin,

Tayvan ve Japonya'da MBL üreten *P.aeruginosa* suşlarının aynı genotipe sahip olduğu sonucuna varılmış, bu sonuçlar doğrultusunda da MBL direncinin klonal bir şekilde yayıldığı düşüncesine varılmıştır (Lee ve ark 2002).

Kökenler arasında çapraz direncin oldukça yüksek olması klinisyenin ampirik tedaviye başlamasını ya da tedavinin devamını zorlaştırmaktadır. Tedavilerinde karbapenem antibiyotiklerin tercih edildiği infeksiyonlarda etkeni izole etmek kadar etkenin MBL üretiminin basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla tespit edilmesi de önem kazanmaktadır. İmipenem-EDTA kombine disk testi, MBL G-Test, Modifiye Hodge testi gibi çeşitli fenotipik yöntemleri kullanan çalışmalar bulunmaktadır. Böyle çalışmaların bazıları olumlu sonuçlar verirken bazılarında yalancı pozitifliğin yüksek olduğu görülmektedir. Farklı ülkelerde farklı MBL prevalanslarının bu sonuçlar üzerindeki etkisi büyüktür (Sarı ve ark 2007).

Ülkemizde yapılan MBL tarama çalışmaları sınırlı sayıdadır ve belli bir standart yöntem olmadığı için MBL taramak için değişik yöntemler denenmiştir. Hodge testini Lee ve ark (2001) modifiye ederek MBL üretiminin saptanması için kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada hastane infeksiyonu kökenli 493 *P.aeruginosa* suşunda Modifiye Hodge yöntemi kullanarak %5,6 oranında MBL pozitifliği bulmuşlardır. Jesudason ve ark (2005) 50 izolatın %32'sinde aynı yöntemi kullanarak pozitiflik saptamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Çakar (2005) Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde izole ettiği 110 *P.aeruginosa* suşunda MBL varlığını farklı fenotipik yöntemler kullanarak araştırmış ve Modifiye Hodge testinde %5,5 oranında pozitiflik bulmuştur. Fidan ve ark (2005) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 40 *P.aeruginosa* suşunun %5'inde MBL üretimine rastlamışlardır. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yapılan çalışmada Modifiye Hodge yöntemiyle) 52 *P.aeruginosa* suşunda %58 oranında pozitiflik bulurken gene aynı hastanede yapılan araştırmada 189 izolatın %58'inde MBL varlığı tespit etmişlerdir (Tetik 2008, Sesli-Çetin ve ark 2009). Saraç (2011) Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde çeşitli servislerde yatan hastane infeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilmiş 29 suşu modifiye hodge yöntemiyle incelemişler ve %20,7 oranında pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir. Bizim

çalışmamızda MBL varlığı Modifiye Hodge testi ile fenotipik olarak incelenmiş ve klinik örneklerden izole edilen 100 *P.aeruginosa* suşunda %20 pozitiflik bulunmuştur.

Luzzaro ve ark (2004) İtalya'da yaptıkları araştırmada 82 *P.aeruginosa* suşunu çalışmaya dahil etmişler ve MBL varlığının araştırılmasında G Test yöntemi uygulayarak %9,8 pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir. Khosravi ve ark (2008) klinik örneklerden izole edilen hastane infeksiyon etkeni olan 41 *P.aeruginosa* suşunun %19,5'inde MBL varlığını G Test yöntemi ile tespit etmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Toraman ve ark (2004) 52 *P.aeruginosa* izolatında %24 oranında G Test yöntemiyle pozitiflik, Bayraktar ve ark (2004) klinik örneklerden izole edilen 27 suşun %66'sında, Sesli Çetin ve ark (2009) hastane infeksiyonu etkeni olan 189 *P.aeruginosa* suşunun prevelansını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada MBL varlığını G Test yöntemiyle incelemiş %40 oranında pozitiflik olduğunu bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda imipenem/imipenem+EDTA G Test yöntemiyle MBL pozitifliği %17 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalara bakıldığında MBL değerlerimizin düşük olması, uygulanan fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan birçok çalışma ve araştırmalar son yıllarda meydana gelen gelişme ve ilerlemeler yaşam kalitesini ve süresini artırırken bir taraftan uygulanan girişimsel işlemler, yoğun antibiyotik kullanımı veya antibiyotiklerin gereksiz kullanımları, dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve hastane infeksiyonlarında artışa neden olmaktadır. Bunun yanı sıra bakteriler biyofilm oluşturmaya başlayarak hem immün sistemden hem de antimikrobiyal maddelerden korunmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere çeşitli yollarla direnç gösterir. Bunların belli başlıları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı üreme hızları ve mikro çevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir. Son yıllarda tedavi seçimlerinde yenilikler yapılmasına yönelik fikirler gündemdedir. Çünkü artık ideal tedavi, biyofilm matriksindeki ekstraselüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterebilecek

ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek nitelikte antimikrobiyal ajanlar içermelidir (Donlan 2008).

Biyofilmler mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, mikroorganizmalar ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de biyofilm oluşturabilme yeteneği kazanabilirler (Jefferson 2004). Farklı fizyolojik mikro çevrelerde, üremenin yavaşlaması bakterileri antibiyotiklerden korunmasını sağlamaktadır (Spoering ve Lewis 2001). Antibiyotik içeren mikro çevrelerde de bakteriler biyofilm oluşturarak antibiyotik etkisinden korunmaya çalışıyor olabilir.

Yurt dışında ve ülkemizde biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalara bakıldığında birçok farklı yöntem uygulandığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda biyofilm varlığı mikroplate yöntemi ile kristal viyole kullanılarak test edilmiştir. Buna benzer araştırmalar incelendiğide; Yassein ve ark (1995) klinik örneklerden izole ettikleri 50 *P.aeruginosa* suşunun %40'ında biyofilm varlığı tespit etmişlerdir. Delissalde ve Amabile-Cuevas (2004) hastane infeksiyon etkeni olan 162 *P.aeruginosa* izolatının %18'inde biyofilm oluşumu bulmuşlardır. Moskowitz ve ark (2005) çeşitli servis ve kliniklerden izole edilen 96 suşun %73'ünde biyofilm oluşumunu pozitif olarak bildirmişlerdir.

Ülkemizde benzer çalışmalarda ise; Çoban ve ark (2009) kistik fibrozisli hastalardan izole ettikleri 60 *P.aeruginosa* suşunun %33,3'ünde biyofilm pozitifliği olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark (2008) 148 suşun %45'inde, Çelik ve ark (2010) 104 izolatın %48'inde biyofilm oluşumunun pozitif olduğunu tespit etmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada klinik örneklerden izole edilen toplam 100 *P.aeruginosa* suşunun %8'inde biyofilm varlığı saptanmış ve yapılan diğer çalışmalara göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bakteri direncinin giderek artması da bu bakterilerden kaynaklanan hayati tehlikeye neden olabilecek infeksiyonların tedavilerinde ve kontrolünde güçlüklerle karşılaşılmasına hatta bazen imkânsızlaşmasına neden olmaktadır. Direnç oranları ve dirençten sorumlu olası enzimler her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermekle

birlikte her merkez için değişmeyen bir gerçek, oranların gün geçtikçe artmakta olduğudur.

Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) raporlarına göre 2012 yılında yapılan araştırmada toplam 1209 *P.aeruginosa* suşu izole edilmiş ve antibiyotik duyarlılık durumları analiz edilmiştir. En yüksek direnç oranı seftazidime (%37,2) en düşük direnç ise amikasine (%9,8) karşı belirlenmiştir. aminoglikozid grubu antibiyotiklerin P.aeruginosa'ya karşı en etkili antibiyotikler olduğu görülmüştür. Aminoglikozidleri takiben florokinolonlar siprofloksasine %23,3 direnç oranı ile *P.aeruginosa*'a karşı en etkili olan ikinci antibiyotik sınıfı olarak bulunmuştur. İmipeneme direnç oranı %30,6, piperasilin/tazobaktama direnç oranı %25,2 ve meropeneme direnç oranı %27 olup beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları benzer saptanmıştır.

Otuz ülkenin katıldığı EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) 2012 verileri ile UAMDSS 2012 verileri karşılaştırıldığında ülkemizde piperasilin/tazobaktam'a %25,2 oranında saptanan direncin Avrupa ortalaması %19,8 olarak bildirilmiş ve yedi Avrupa ülkesinde %25'in üzerinde olduğu görülmektedir. Ülkemizde seftazidime %32,7 olarak saptanan direnç oranını Avrupa ortalaması %13,5 olup, sadece üç Avrupa ülkesinde Türkiye'den daha yüksek bulunmuştur. Florokinolonlara %23 olarak saptanan direnç oranının Avrupa ortalaması %21 olup, yedi ülkede Türkiye'den düşük, 15 ülkede aynı, sekiz ülkede yüksek olduğu görülmüştür. Ülkemizde %28 olarak saptanan karbapenemlere direnç oranı dokuz ülkede Türkiye'den düşük, 15 ülkede aynı, altı ülkede yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak Türkiye'de antibiyotiklere direnç oranları Avrupa direnç ortalamalarından yüksek olup, ülkemiz piperasilin-tazobaktam ve seftazidim direnci ile EARS-Net (2012)'de en yüksek direnç oranlarının görüldüğü ülkelerle aynı kategoride yer almaktadır.

Bizim çalışmamızda *P.aeruginosa* izolatlarına en dirençli antibiyotik sırasıyla aztreonam, piperasilin/tazobaktam ve seftazidim olarak tespit edilmiştir. En düşük direnç oranları ise sırasıyla tobramisin, sefepim, amikasin ve gentamisinedir. Aminoglikozidlerin *P.aeruginosa* tedavisinde en etkili antibiyotik grubu olduğunu düşündürmüştür. Direnç yüzdelerine bakıldığında beta-laktam antibiyotiklere karşı

direncin, aminoglikozid ve florokinolonlardan daha yüksek olduğu görüşmüştür. Ampirik tedavide bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Hastanemizde ve diğer hastane rutin laboratuvar çalışmalarında karbapenemlere direnç, diğer beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençli ve beta-laktamaz üretimi olan *P.aeruginosa* suşlarında İBL, MBL pozitifliği araştırılarak klinisyene rapor edilmelidir. MBL enzim varlığının saptanması sayesinde infeksiyon kontrol önlemleri hızlı ve etkin olarak uygulanabilir. Böylece dirençli suşların seleksiyonu ve direncin diğer Gram negatif bakterilere aktarılmasının önlenebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2013-2015 yılları arasında üreyen 100 *P.aeruginosa* izolatı çalışmaya alınmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının İBL, MBL ve biyofilm oluşturma yetenekleri ile antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda *P.aeruginosa* izolatları en sık Göğüs Hastalıkları Servisi'nden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. *P.aeruginosa* izolatlarında en fazla direncin beta-laktam gurubu antibiyotiklerden aztreonam ve piperasilin/tazobaktama olduğu belirlenmiştir. İBL oranının yüksek (%89) olması nedeniyle klinik hekimin tedavi seçeneğinin kolaylığı açısından İBL üretiminin laboratuvar tarafından belirlenip rapor edilmesi uygun olacaktır. *P.aeruginosa* infeksiyonlarında kültürün ve üreme olursa antibiyogramın 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması gereklidir. Ayrıca 3. kuşak sefalosporinlerin ve diğer beta-laktamların duyarlı olmasına rağmen ampirik tedavide tek başlarına kullanılması İBL üretimini indükleyeceğinden, diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının, hastanemizdeki *P.aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisi için doğru bir yaklaşım olacağını düşündürmüştür.

Günümüzde MBL varlığı rutin olarak tespit edilmemektedir ve beta-laktamlara dirençli kökenler tedavide zorluklara yol açmaktadır. Bu yüzden bu enzimlerin epidemiyolojik açıdan tanımlanarak direnç yayılımının kontrol edilmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, klinik infeksiyonlara yol açan mikroorganizmaların birçoğunun biyofilm oluşturduğu ve bu biyofilmlerin, antimikrobiyallere direnç konusunda önemli rol oynadığı ve bu sebeple infeksiyonların tedavisinde önemli bir engel teşkil ettiği çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur. Antibiyotiklere direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmaları bilinmeli ve direnç gelişimi önlenmelidir. Beta-laktamazların ve bu beta-laktamazları kodlayan genleri taşıyan kökenlerin saptanması infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, infeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve infeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Akalın H, 2003. Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. In: Hastane İnfeksiyonları. Eds: Doğanay M, Ünal S. Ankara: Ankara Bilim Tıp Yayınevi, p. 269–89.

Altun HU, Şener B, 2008. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi, 39,82-8.

Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L, 1998. Slime production and expression of the slime-associated antigen by Staphylococcal clinical isolates. J Clin Microbiol, 37,3235-8.

Arda B, Ulusoy S, 2008. Kinolonlar. In: Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. Eds: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, p. 497-512.

Bagge N, Schuster M, Hentzer M, 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. Antimicrob Agents Chemother, 48, 1175-87.

Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E, 2004. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-betalaktamaz üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 34, 248-52.

Berktaş M, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Yaman G, 2011. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi. Fırat Tıp Dergisi, 16(3), 125-8.

Bilgehan H, 2000. Non-fermantatif gram olumsuz bakteriler. In: Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları. Ed: Bilgehan H, 10.baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, s. 422.

Blondell E, Henry DA, Speert DP, 2007. Pseudomonas. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, 9th ed. Washington, DC: ASM Press, p. 734-48.

Brady MT, 2009. *Pseudomonas* and Related Genera. In: Feigin&Cherry's text book of pediatric infectious diseases. Eds: Feigin RD, Demler-Harrison GJ, Cherry JD, Kaplan SL, 6th ed. Philadelphia: John F. Kennedy, p. 1651-69.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, 2007. Pseudomonas, Acinetobacters, & uncommon Gram-negative bacteria. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. Eds: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies, p. 263-7.

Bush K, 2001. New β-lactamases in gram-negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis, 32, 1085-9.

Bush K, Jacoby GA, 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 54, 969–76.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH, 1999. Emergence of antibioticresistant *Pseudomonas aeruginosa:* comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother, 43(6), 1379-82.

Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R, 2000. The astonishing complexity of antibiotics resistance. Clin Microbial Infect, 6, 93–4.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ, 1978. How bacteria stick. Scientific American, 238, 86-95.

Cunha BA, 2002. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. Semin Respir Infect, 17(3), 231-9.

Çakar A, 2005. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'de ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Çelik İ, Cihangiroğlu M, Akbulut A, 2007. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz sıklığı. Fırat Tıp Dergisi, 12(4),284-6.

Çiftçi İH, Çetinkaya Z, Aktepe OC, 2005. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 35, 98-102.

Çiftçi Z, 2005. Kronik tonsillitte biyofilmin rolü, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, İstanbul.

Çoban AY, Çiftçi A, Onuk EE, Erturan Z, Çaycı TY, Durupınar B, 2009. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 43,563 – 73.

Delissalde F, Amabile Cuevas CF, 2004. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents, 24(4),405-8.

Donlan RM, Casterton JW, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically revelant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15 (2), 167 – 93.

Drlica K, Zhao X, 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev, 61,377-92.

Dunne WM, Hardin DJ, 2005. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. *Citrobacter* spp. and *Serratia* spp. J Clin Microbiol, 43(12), 5945-9.

Edwards JR, 1995. Meropenem: a microbiological overview. J Antimicrob Chemother, 36,1-17.

Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G, 2007. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 37(3),142-6.

European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) MIC breakpoints – the reference for routine susceptibility testing methods ECCMID, 2014.

Erdem B, 1999. Hastane infeksiyonlarına yol açan bakteriler. In: Temel ve klinik mikrobiyoloji. Eds: Ustaçelebi Ş. Ankara: Güneş Basımevi, p. 733-7.

Fidan I, Çetin Gürelik F, Yüksel S, Sultan N, 2005. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-betalaktamaz sıklığı. ANKEM Derg, 19, 68-70.

Fonseca AP, Sousa JC, 2007. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. Int J Antimicrob Agents. 30, 236-41.

Gilardi GL, 1991. *Pseudomonas* and Related Genere. In: Manuel of Clinical Microbiology. Eds: Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, 5th ed. Washington DC: ASM Press, p. 448-57.

Gül, M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E, 2004. Türk hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığının E-Test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. Mikrobiyol Cem Derg, 34, 33-6.

Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Derg,17(3), 192 -204.

Güler Ö, Aktaş O, Uslu H, 2008. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde beta-laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg, 22(2), 72-80.

Güven Ö, Ünver D, Özdemir S, 2008.Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg, 38, 112-6.

Handerson IR, Nataro JP, 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. Infection and Immunity, 69(3), 1231-43.

Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, 2003. Clinical and bacteriological Characteristics of IMP-type Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. CID, 37(26), 32.

Hooper DC, 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti- topoisomerase resistance. Clin Infect Dis, 27, 54-63.

Jefferson KK, 2004. What drives bacteria to produce a biofilms. FEMS Microbiol Lett, 236(2),163-73.

Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V, 2005. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta- lactamase production in clinical isolates. Indian J Med Res, 121(6),780-3.

Jones RN, Barry AL, Thornsberry C, Gerlach EH, Fuchs TC, Gavan TL, Sommers HM, 1981. Ceftazidime a pseudomonas-active cephalosporin: in-vitro antimicrobial activity evaluation including recommendations for disc diffusion susceptibility tests. J Antimicrob Chemother. p. 187-211.

Kaplan J B, 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of Dental Research, 89 (3), 205-18.

Karakoç C, Tekin R, Yeşilbağ Z, Çağatay A, 2013. Risk factors for mortality inpatients with Gram-negative rod bacterimia. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci, 17, 951-7.

Karatan E, Watnick P, 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73 (2), 310-47.

Karatuna O, Yağcı A, 2008. *Pseudomonas aeruginosa* 'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 38(1), 42-51.

Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF, 2003. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical iosalates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2002. Antimicrob Agents Chemother, 47(5), 1681-8.

Kerr KG, Snelling AM, 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and everpresent adversary. J. Hosp. Infect, 73, 338-44.

Khosravi AD, Mihani F, 2008. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. Diagn Microbiol Infect Dis, 60, 125-8.

King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS 2009. Lipopolisaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa.* Innate Immunity, 15, 261-312.

Kiska DL, Gilligan PH, 2003. *Pseudomonas* In: Manual of clinical microbiology. Eds: Baron JE, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, 8th ed. Washington DC: ASM Press, p. 719-28.

Koluman A, 2006. Biofilm production by clinical isolates of candida species. Medical Mycology Journal, 44, 99 –101.

Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F, 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Infection. Trends in Molecular Medicine, 10(12), 600-5.

Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH, 2001. Modified Hodge and EDTA disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas and Acinetobacter species*. Clin Microbiol Infect, 7(2), 88-91.

Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM, 2002. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother, 46(4), 1053-8.

Lister PD, Wolter DJ, Hansen ND, 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impacct and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical Microbiology Reviews, 22(4), 582-610.

Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, 2004. Prevalance and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diag Microbiol Infect Dis, 48(2), 131-5.

Maeda K, Kobayashi Y, Oie S, 2008. Antimicrobial effects of drugs against multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Biol Pharm Bull, 31(10), 1898-901.

Maejima K, Deitch EA, Berg RD, 1984. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. Infect. Immun, 1, 6-10.

Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA, 1995. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, p. 212-24.

Mederios AA, 2000. Cooperative evolution of mechanisms of ß-lactam resistance. Clin Microbiol Infect, 6(3), 3-5.

Moore NM, Flaws ML, 2011. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clinical Laboratory Sci, 24, 43-6.

Moskowitz SM, Jessica MF, Emerson JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL, 2005. Use of Pseudomonas Biofilm Susceptibilies to Assign Simulated Antibiotic regimens For Cystic Fibrosis Airwar Infection. Jounal of Antimicrobial Chemotheraphy**,** 56, 879 – 86.

Nordmann P, Guibert M, 1998. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42, 128-31.

Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE, 1999. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob Agents Chemother, 43(5), 1085-90.

Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A, 2009. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Infect Dis, 10(9), 123.

Oldacay M, Oldacay S, Erdem G, 2003. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında kromozomal beta-laktamaz yapımı. İnfek Derg, 17, 197-9.

Petersen FC, Tao L, Scheie AA, 2005. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. Journal of Bacteriology, 187 (13), 4392-400.

Pier GB, Ramphal R, 2005. *Pseudomonas aeruginosa* In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p: 2587-614.

Pitt TL, Simpson AJH, 2006. *Pseudomonas and Bulkholderia spp*. In: Principles and practice of clinical bacteriology. Eds: Gillespie SH, Hawkey PM, 2th ed. UK: John Wiley and Sons Ltd, p. 427-35.

Poirel L, Nordmann P, 2002. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. Curr Pharm Biotechnol, 3(2), 117-27.

Poole K, 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 49(2), 479-87.

Post JC, Stoodley P, Hall Stoodley L, Ehrlich GD, 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 12(3),185-90.

Sa´nchez A, Gattarello S, Rello J, 2011. New treatment options for ınfections caused by multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli. Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine, 32, 151-58.

Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszañska D, Tryniszewska E, 2008. Metallo-β-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* novel mechanism resistance to β-lactam antibiotics. Folia Histochemica Et Cytobiologica, 46, 137-42.

Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J, Hachani A, Kowalska A, Filloux A, 2010. High level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol phosphorylated β-(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology, 20(7), 895-904.

Sakarya S, 2005. Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. Klimik Dergisi, 18 (1),3-8.

Sanders CC, 1992. Beta-lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. Clin Infect Dis, 14(5), 1089-99.

Sanders CC, Sanders WE, 1987. Clinical importance of induc betalactamases in gram-negative bacteria. Eur J Clin Microbiol, 6(4),435-38.

Saraç G, 2011. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenem direnci ve direncin moleküler olarak saptanması. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.

Sarı H, Özer S, Gençer S, Batırel A, Balkan İ, Karagöz G, 2007. Karbapenemlere dirençli gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. Flora Dergisi, 12(4),167-84.

Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC, Colmer Hamood JA, Burrowes BH, Dhevan V, Griswold JA, Hamood AN, 2007. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol, 56(6),738-48.

Sesli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Arıdoğan BC, 2009. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması, İnfeksiyon Derg, 23(2), 51-5.

Spoering AL, Lewis K, 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J Bacteriol, 183(23), 6746-51.

Strateva T, Yordanov D, 2009. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol, 58(9), 1133-48.

Strateva T, Yordanov D, 2009. Pseudomonas aeruginosa-a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol, 58(9), 1133-48.

Şenol E, 2002. Siprofloksasin. ANKEM derg, 16(3), 382-4.

Tenover FC, 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control, 34, 3-10.

Tetik T, 2008. Süleyman Demirel üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde izole edilen Gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo-beta-laktamaz enzim aktivitesinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kizirgil A, 2005. Pseudomonas ve Acinetobacter suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. İnfeksiyon Derg,19(1), 101-5.

Vahaboğlu H, Akhan S, 2008. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer pseudomonas türleri. In: Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Eds: Willke Topçu A,Söyletir G, Doğanay M, 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, p. 2175-86.

Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J, 2008. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. Indian J. Med. Res, p. 398-402.

Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas Chanoin MH, 1995. The prevalence of nosocomial infections in intensive care units in Europe: Results of the European Prevalence infection in Intensive Care (EPIC) Study. JAMA, 274(8),639-44.

Vincent, JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman, J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA, 302(21), 2323-9.

Wagner VE, Iglewski BH, 2008. *P.aeruginosa* biofilms in CF infection. Clinic Rev Allerg Immunol. 10, 8079-90.

Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordman P, 2005. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm. Clinical Microbiology Reviews, 18(2), 306-25.

White Friedrich L, Burgess D, Warkentın D, Bosso J, 1996. Comperative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother , 40(4), 904-8.

Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. USA: Philadelphia, Lippincott Williams Wilkins, p. 317-23.

Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A, 2001. Occurrence of beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. Katedra Mikrobiologii Akademii Podlaskiej w Siedlcach. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Med Dosw Mikrobiol. 53(1),45-51.

Yassein M, Khardori N, Ahmedy A, Toama M, 1995. Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. Antimicrobial Agenst and Chemotheraphy, 39 (10), 2262 – 8.

Yıldırım N, Sezen Y, Ardıç N, İleri Ç, 2008. Farklı klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilokokların slime faktör üretimlerinin ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 22(4), 209 – 14.

Yüce A, 2001. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi, 2, 41-6.

Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öztürk CE, Şahin İ, 2006. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde izlenmesi. ANKEM dergisi, 20(3),152-5.

Zar H, Saiman L, Quittel L, 1995. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. Journal of Pediatrics, 126, 230-3.

Zhao WH, Hu ZQ, 2010. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Critical Reviews in Microbiology, 36, 245-58.

7. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**Tuğçe SOYLAMIŞ
Uyruğu	**:**T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**Ankara/ 26.06.1990
Telefon	**:**+90 542 287 86 90
E-mail	**:** tugcesoylamis@gmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İl**	**Bitirme Yılı**
İlkokul	Şehit Piyade Teğ. Hakan Kabil İ.Ö.O, Ankara	2004
Lise	Mehmetçik Lisesi, Ankara	2008
Üniversite	Gazi Üniversitesi, Ankara	2013
Yüksek Lisans	Selçuk Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Konya	-