

**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ
ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARINDA AKTİF ATIM
POMPALARI VE PORİN PROTEİNLERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hüseyin Ağâh TERZİ

ARALIK-2012

**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ
ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARINDA AKTİF ATIM
POMPALARI VE PORİN PROTEİNLERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hüseyin Ağâh TERZİ

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

Doç. Dr. Canan KÜLAH

ARALIK-2012

BEYAN

Bu çalışma Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 02/09/2010 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

22/11/2012

Hüseyin Ağâh TERZİ

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi, fikir ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Canan KÜLAH'a ve Sayın Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye,

Asistanlık dönemimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, gösterdikleri sabırla yetişmemde büyük emekleri olan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Fusun CÖMERT'e, Sayın Doç. Dr. Elif AKTAŐ'a ve Sayın Doç. Dr. Ahmet ÖZBEK'e

Tezimdeki PAO1 referans suőunu temin etmemi sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fethiye KOLAYLI'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm Uzm. Dr. Engin KARAKEŐE'ye, Uzm. Dr. Tayfur DEMİRAY'a ve Uzm. Ali Rıza ATASOY'a, beraber çalışmaktan ve onları tanımış olmaktan mutluluk duyduğum asistan ve laborant arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana destek veren ve yaptığım bütün işlerde en yakınımda bulunarak benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşim Mehmet Akif'e çok teşekkür ederim.

Saygılarımla,

Dr. Hüseyin Agâh TERZİ

SAKARYA, 2012

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ	viii
TABLO DİZİNİ.....	ix
RESİM DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. PSEUDOMONAS	3
2.2. GENEL TANIMLAMA VE SINIFLANDIRMA.....	4
2.3. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ	5
2.3.1. Koloni	5
2.3.2. Pigment	5
2.4. PATOGENEZ	6
2.4.1. Virulans Faktörleri	6
2.4.2. Klinik Olarak Etken Olduğu Enfeksiyonlar.....	8
2.4.2.1. Solunum Sistemi Enfeksiyonları	8
2.4.2.2. Kistik Fibroz	8
2.4.2.3. Bakteriyemi	8
2.4.2.4. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları	9
2.4.2.5. Endokardit	9
2.4.2.6. Kulak Enfeksiyonu	9
2.4.2.7. Göz Enfeksiyonları	9
2.4.2.8. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları	10
2.4.2.9. Üriner Sistem Enfeksiyonu.....	10
2.4.2.10. Gastrointestinal Enfeksiyonlar	10
2.4.2.11. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	10
2.5. ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ	10
2.5.1. Kazanılmış Direnç Mekanizmaları	11
2.5.2. Kromozomal Kaynaklı Direnç Mekanizmaları	12
2.6. DİRENÇ MEKANİZMALARI	14
2.6.1. OprD İlişkili Direnç	14
2.6.2. Atımla İlişkili Direnç	15
2.6.2.1. MexAB-OprM Atım Pompası	18
2.6.2.2. MexCD-OprJ Atım Pompası	18

2.6.2.3. MexEF-OprN Atım Pompası.....	19
2.6.2.4. MexXY Atım Pompası.....	20
2.6.2.5. MexJK Atım Pompası.....	21
2.6.2.6. Diğer RND Atım Pompaları.....	21
2.6.3. AmpC İlişkili Direnç.....	22
2.6.3.1. AmpC ve β -laktamlara Direnç.....	22
2.6.3.2. AmpC Aşırı Üretim Yolları.....	22
2.6.3.3. <i>ampC</i> Ekspresyonun Düzenlenmesinde Gerekli Olan Faktörler.....	23
2.6.3.4. <i>ampC</i> İndüksiyon Mekanizması.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. İZOLATLARIN TOPLANMASI.....	25
3.2. İZOLATLARIN ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ.....	25
3.3. KÜLTÜR VE BAKTERİ TANIMLAMASI.....	26
3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	26
3.4.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi.....	26
3.4.2. İndüklenebilir Beta-Laktamaz (İBL) Tanı Yöntemi.....	27
3.4.3. MİK'lerin Belirlenmesi.....	27
3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERİZE ZİNCİR REAKSİYONU (qPCR).....	28
3.5.1. RNA İzolasyonu.....	28
3.5.2. cDNA Sentezi.....	29
3.5.3. cDNA Çoğaltılması (Amplifikasyon).....	29
3.5.4. qPCR'daki Gen Ekspresyon Analizi.....	32
3.5.4.1. Gerçek Zamanlı Kantifikasyon Yöntemi.....	32
3.5.4.2. Göreceli (Relative) Kantifikasyon.....	32
3.5.4.3. Amplifikasyon Etkinliği.....	33
3.5.4.4. Normalizasyon.....	33
3.5.4.5. Matematiksel Yöntem.....	34
3.6. ARBİTRARİLY PRİMED POLİMERİZE ZİNCİR REAKSİYONU (AP-PCR).....	35
3.6.1. DNA Eldesi.....	35
3.6.2. DNA Çoğaltılması (Amplifikasyon).....	35
3.6.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	36
3.7. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. İZOLAT ÖZELLİKLERİ.....	38
4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	39
4.2.1. Konvansiyonel Duyarlılık Sonuçları.....	39
4.2.2. Otomatize Sistemle Belirlenen MİK Düzeyleri.....	42
4.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.....	43
4.3.1. qPCR Sonuçları.....	43
4.3.1.1. <i>oprD</i> Gen Ekspresyonu.....	44
4.3.1.2. <i>ampC</i> Gen Ekspresyonu.....	44

4.3.1.3. Atım Pompa Genlerinin Ekspresyonları	45
4.3.1.3.1. <i>mexB</i> Gen Ekspresyonu	45
4.3.1.3.2. <i>mexD</i> Gen Ekspresyonu	45
4.3.1.3.3. <i>mexF</i> Gen Ekspresyonu	45
4.3.1.3.4. <i>mexY</i> Gen Ekspresyonu	46
4.3.2. AP-PCR Sonuçları	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69

KAYNAKLAR

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı

KISALTMA VE SİMGELER

AK	: Amikasin
AMK	: Amoksisilin-klavulonat
AP-PCR	: Arbitrarily primed PCR
ark.	: Arkadaşları
bç	: Baz çifti
C	: Santigrad
CAZ	: Seftazidim
CİP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	: Gentamisin
CTX	: Sefotaksim
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetat
EMB	: Eozin metilen mavisi
FEP	: Sefepim
GES	: Guiana extended spectrum
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
gr	: Gram
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
LEV	: Levofloksasin
M	: Molar
MDR	: Multi Drug Resistance (Çoklu İlaç Direnci)
Mex	: Multiple efflux
MFP	: Membran füzyon proteini

mg	: Miligram
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
OMF	: Dış membran faktörü
pmol	: Picomolar
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	: Gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu
QRDR	: Quinolone Resistance Determining Region (Kinolon Direnci Belirleyici Bölge)
TBE	: Tris- Borik asit –EDTA
TE	: Tris –EDTA
TOB	: Tobramisin
Tri	: Triclosan efflux

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Klinik önemi olan bazı Pseudomonasların sınıflandırılması	4
Tablo 2. <i>P. aeruginosa</i> 'daki RND atım pompalarının özellikleri	17
Tablo 3. <i>P. aeruginosa</i> için Zon Çapları Yorumlama Standartları.....	27
Tablo 4. MİK'lerin yorumlama standartları.....	28
Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri.....	30
Tablo 6. <i>P. aeruginosa</i> izolatının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı....	38
Tablo 7. <i>P.aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı.....	39
Tablo 8. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	41
Tablo 9. Minimal İnhibitor Konsantrasyonlar (MİK).....	42
Tablo 10. Göreceli Gen Ekspresyonu.....	43
Tablo 11. Çeşitli Direnç Fenotiplerindeki İzolatlarda Direnç Genlerinin Aşırı Ekspresyonu ve Down regülasyonu.....	46
Tablo 12. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının AP-PCR çalışması sonrasında gruplandırılması ve mRNA ekspresyon düzeyleri.....	49

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. <i>P. aeruginosa</i> 'daki RND atım pompalarının yapısı ve fonksiyonu	16
Şekil 2. Döngülere karşılık gelen Floresans Değerlerinin Ölçümüyle Elde edilen Amplifikasyon Eğrileri	47
Şekil 3. Direnç genlerinin ekspresyonlarının 'delta-delta C _t ' metoduyla hesaplanan kantitatif değerlerinin analizi	47
Şekil 4. qPCR sonrası Erime Eğrisi analiziyle PCR ürünlerinin tanımlanması	48

RESİM DİZİNİ

Resim 1. AP-PCR sonrası <u>amplifikasyon ürünlerinin</u> <u>agaroz jel elektroforez</u> görüntüsü.....	48
--	----

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARINDA AKTİF ATIM POMPALARI VE PORİN PROTEİNLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada çoğul ilaç dirençli, izole karbapenem ve izole kinolon dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi ve antibiyotik direncinde aktif atım pompalarının ve porin proteinlerinin etkisinin araştırılması amaçlandı. Laboratuvarımıza Kasım 2010 ve Kasım 2011 tarihleri arasında rutin olarak gönderilen tüm klinik örneklerden izole edilen izolatlar tür düzeyinde tanımlandı. Çalışmaya dahil edilen 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapılarak CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Otomatize Vitek 2 sistemiyle (bioMerieux, Fransa) seftazidim, gentamisin, piperasilin, siprofloksasin, imipenem ve meropenemin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlendi. *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *ampC*, *oprD* bölgelerinin transkripsiyon ürün seviyeleri gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle belirlendi. Birbiriyle bağlantılı suşlar arasındaki benzerliği değerlendirebilmek için arbitrarily primed PCR (AP-PCR) kullanıldı.

Çalışmamızda dört farklı gruba ayırarak incelediğimiz 50 izolat arasında *oprD* down regulasyonunu, atım pompa ve *ampC* aşırı ekspresyonlarını gösteren genlerin görülme sıklığı sırasıyla *mexD* (%88), *mexB* (%76), *mexF* (%46), *ampC* (%46), *mexY* (%40), *oprD* (%38) olarak belirlendi. İzolatlar arasındaki benzerliği gösterebilmek için kullandığımız AP-PCR yöntemiyle de 18 farklı patern tespit edildi.

Çalışmamızdaki imipenem dirençli 38 izolatın 32'sinde (%84) *mexD*, 26'sında (%68) *mexB*, 23'ünde (%61) *ampC*, 19'unda (%50) *mexY*, 15'inde (%39) *mexF* aşırı ekspresyonu görüldü. *oprD* mRNA düzeyleri, imipenem dirençli 38 izolatın 20'sinde düşük bulundu. Dokuz izolatta ise *oprD* miktarı tespit edilemedi. İzole karbapenem dirençli grupta *oprD* mRNA düzeylerinde anlamlı azalma görülen 4 izolattan birinde sadece *oprD* down regulasyonu görülürken diğer 3 izolatta eş

zamanlı olarak *mexB* aşırı ekspresyonu, birinde *mexD* aşırı ekspresyonu ve ikisinde *ampC* aşırı ekspresyonu tespit edildi.

Çalışmamızdaki meropenem dirençli 35 (%70) izolat arasında MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM atım sistemlerinin aşırı ekspresyonu sırasıyla 25 (%71), 28 (%80), 16 (%46) ve 19 (%54) bulundu. Meropenem dirençli bu izolatlarımızın 33'ünde (% 94) atım sistemlerinden en az birinin tespit edilmesi ise meropenem direncinde bu mekanizmaların katkısını göstermektedir. Meropenem dirençli 35 (%70) izolat arasında *mexB* aşırı ekspresyonu olmayan 6 izolatın 5'inde *oprD* ekspresyonu anlamlı şekilde düşük tespit edildi.

Meropeneme direnç gelişiminde OprD kaybı ve MexAB-OprM pompasının upregulasyonu rol oynadığından meropeneme direnç gelişimi imipeneme direnç gelişiminden daha zordur. Çalışmamızdaki imipenem dirençli 38 izolatın 30'u meropenem dirençli bulunmuştur. İzole karbapenem dirençli 9 izolattan 7'sinde *oprD* miktarındaki azalma ile imipenem ve meropenem MİK'lerinde görülen eş zamanlı artış, *oprD*'nin karbapenem direncindeki etkisini kuvvetle desteklese de direnç genlerinin aşırı ekspresyonlarının da eş zamanlı olarak görülebilmesi direnç gelişimindeki sinerjistik etkiyi düşündürmektedir.

İzole kinolon dirençli gruptaki 12 izolatta *oprD* miktarı 6 izolatta düşük bulundu. Bu gruptaki *mexF* ekspresyonunun biri hariç diğer tüm izolatlarda yüksek bulunması, imipeneme duyarlı olan bu izolatlarda *mexF* aşırı ekspresyonu ile *oprD* down regulasyonunun ilişkili olabileceğini ve imipeneme direnç gelişimindeki etkisinin ilave çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini göstermektedir.

AmpC aşırı ekspresyonu görülen suşların 21'i (%91) antipseudomonal β -laktamlara ve aminoglikozidlere dirençli izolatların bulunduğu birinci grupta görüldü. Üçüncü ve dördüncü gruptaki kinolon dirençli izolatlarda aşırı ekspresyon görülmemesi ise AmpC'nin kinolon direncinde etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz direnç genlerinin *P. aeruginosa* direnç mekanizmalarındaki yeri büyüktür. Bu mikroorganizmayla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde izlenen protokölüne tanımlanan bu mekanizmalar yol göstermektedir. Antimikrobiyal dirençle mücadelede yeni stratejilerin

geliştirilmesinde öncelikle yapılması gereken bu direnç mekanizmalarının ekspresyonunun hangi mekanizmalarla düzenlendiğinin açıklanması olmalıdır.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ACTIVE EFFLUX PUMPS AND PORINE PROTEINS IN ANTIBIOTIC RESISTANCE MECHANISM OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the antibiotic sensitivity patterns of multiple drug, isolated carbapenem and isolated quinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates and to investigate the effects of active efflux pumps and porine proteins in antibiotic resistance. The isolates isolated from all the other clinical samples that are routinely sent to our laboratory between November 2010 and November 2011 were identified according to their species. The antibiotic sensitivity tests of 50 clinical *P. aeruginosa* isolates included in the study were carried out by using the Kirby-Bauer disc diffusion method and evaluated in terms of recommendations of CLSI. With Vitek 2 automated system (bioMerieux, France); minimal inhibitor concentrations (MIC) of ceftazidime, gentamicine, piperacilline, ciprofloxacin, imipenem and meropenem were determined. The transcription product levels of *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *ampC*, *oprD* were identified with real-time polymerase chain reaction (qPCR) method. To be able to evaluate the similarity among the strains, arbitrarily primed PCR (AP-PCR) were used.

Among the 50 isolates that we divided into four different groups in our study, the frequency of genes that belonged to *oprD* down regulation, efflux and *ampC* overexpression are determined as; *mexD* (88%), *mexB* (76%), *mexF* (46%), *ampC* (46%), *mexY* (40%), *oprD* (38%) respectively. With the AP-PCR method that we use to show the similarity among isolates, 18 different patterns were determined.

Of imipenem resistant 38 isolates, in 26 (68%) *mexB*, in 32 (84%) *mexD*, in 15 (39%) *mexF*, in 19 (50%) *mexY* overexpression and in 23 (61%) *ampC* overexpression were determined. *oprD* mRNA levels were found to be low in 20 of 38 isolates. No *oprD* were found in nine isolates. In isolated carbapenem resistant group, while in one of the 4 isolates whose *oprD* mRNA levels showed significant decrease were found to have only *oprD* down regulation, the other 3 isolates had simultaneous *mexB* overexpression, one of them had *mexD* overexpression and in two of them, *ampC* overexpression was determined.

Among the 35 isolates (70%) that are meropenem resistant in our study, the overexpression of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM efflux systems were found 25 (71%), 28 (80%), 16 (46%) and 19 (54%) respectively. That determination of at least one efflux system in 33 (94%) of these isolates that are meropenem resistant shows the contribution of these mechanisms in meropenem resistance. Among these 35 (70%) isolates that are meropenem resistant, in 5 of 6 isolates that did not have *mexB* overexpression, *oprD* expression was significantly found to be low.

Because of the fact that in meropenem resistance emergence, OprD loss and up regulation of MexAB-OprM pump take part, emergence of meropeneme resistance is more unlikely than emergence of imipeneme resistance. 30 of 38 isolates in our study were found to be meropenem resistant. Although the decrease in the amount of *oprD* in 7 isolates of 9 that were isolated carbapenem resistant together with simultaneous increase seen in imipenem and meropenem MICs, strongly support the effect of *oprD* in carbapenem resistance, that simultaneous presence of overexpressions of resistance genes were considered the synergistic effect in resistance emergence.

In 12 isolates in isolated quinolone resistant group, *oprD* amount were low in 6 isolates. That *mexF* expression to be found high in all isolates but one in this group show the possible relation between *mexF* overexpression and *oprD* down regulation in these imipenem sensitive isolates and the necessity of further additional studies to support its effect in emergence of imipenem resistance.

21 of strains (91%) in which *ampC* overexpression were seen, were determined in the 1st group that contain isolates resistant to antipseudomonal β -lactams and aminoglycosides. That overexpression not to be seen in the quinolone resistant isolates in 3rd and 4th group considered that AmpC may not have effect in quinolone resistance.

The resistance genes that we analyse in our study have importance in *P. aeruginosa* mechanisms. These mechanisms that were identified lead to the treatment protocol which is followed in the treatment of infections caused by this microorganism. The very first thing to be done on the way to develop new strategies

in struggle with antimicrobial resistance should be to explain which mechanisms regulate the expression of these resistance mechanisms.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gram negatif bakteri türleri, toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu hastalıklar yüzeysel deri enfeksiyonundan fulminan sepsise kadar geniş bir grupta yer almaktadır.¹ *P. aeruginosa* dünya çapında nozokomiyal enfeksiyonların %10-15'inden sorumludur.² Bakterinin birçok antibiyotik grubuna karşı doğal ya da kazanılmış direncine bağlı olarak bu enfeksiyonların tedavisi çoğu kez zordur.³

P. aeruginosa yapısal olarak farklı olan çoğu antimikrobiyal ajana, doğal dirençlidir. Dış membranının geçirgenliğinin az olması (*Escherichia coli* dış membranının geçirgenliğinin 1/100' ü kadar), çeşitli atım pompalarının yapısal ekspresyonu ve doğal olarak bulunan kromozomal AmpC β -laktamaz (sefalosporinaz olarak da bilinir) olması bu direncin sebebi olarak kabul edilir.⁴

Pseudomonaslarda β -laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmaları aktif dışa pompalama sistemleridir. Günümüzde aktif dışa pompalama sistemleri en iyi *P. aeruginosa* 'da araştırılmıştır. Aktif dışa pompalama sistemleri yapısal olup normalde düzenleyici genler ile kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aktif dışa pompalama sistemlerinin aşırı çalışmasını ve antimikrobiyallerin de dışarı atılmasına neden olur.⁴ *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM aktif dışa pompalama sistemlerinden en iyi tanımlanmış olanı MexAB-OprM aktif dışa pompalama sistemidir. MexAB-OprM aktif pompalama sistemi imipenem hariç tüm β -laktamlara ve kinolonlara direnç oluşturması ile önemlidir. Porin proteinlerinden OprD'nin, temel aminoasitlerin ve bu aminoasitleri içeren küçük peptidlerin ve karbapenemlerin hücre içine difüzyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir.⁵

Direnç gelişimi yanlış ve uygun olmayan antibiyotik kullanımı ile artmakta, hastanelerdeki yoğun antibiyotik baskısı sonucunda dirençli izolatlar seçilmektedir. Son yıllarda artan çoklu antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* izolatları, bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde sorun yaratmaktadır. *P. aeruginosa* ile oluşan enfeksiyonlarda tedavi sırasında direnç gelişimini önlemek ve geniş etki spektrumu

sağlamak amacı ile kombinasyon önerilmekte, çoğunlukla da bir antipseudomonal β -laktam ile aminoglikozid veya kinolon kombinasyonu kullanılmaktadır.⁶

Çalışmamızda bir yıllık süre içerisinde Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına rutin olarak kültür istemi ile gönderilen klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi ve antibiyotik direncinde aktif atım pompalarının ve porin proteinlerinin etkisinin araştırılması amaçlandı.

i. Elde edilen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. İzole edilen *P. aeruginosa* izolatlarından çoklu ilaç dirençli (MDR), izole karbapenem dirençli, izole kinolon dirençli ve yalnız karbapenem ve kinolon dirençli olan 4 farklı grup çalışmaya dahil edildi.

ii. Antibiyotik direnci için otomatize Vitek 2 sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılarak *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlendi.

iii. *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *ampC*, *oprD* bölgelerinin transkripsiyon ürün düzeyleri gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle belirlendi. Genlerin transkripsiyon düzeylerini değerlendirmede referans gen olarak ribozomal protein kodlayan *rpsL* kullanıldı.⁷

iv. İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi gösterebilmek için arbitrarily primed PCR (AP-PCR) kullanıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PSEUDOMONAS

Cerrahi yara pansumanlarındaki renk değişikliğinin transfer edilebilir bir ajanla ilişkili olduğunu ilk defa 1850 yılında Sedillot gözlemlemiştir. Mavi rengi veren pigment 1860 yılında Fordos tarafından ekstrakte edilmiş ve bu pigment ilk defa 1862 yılında Lucke tarafından çomak şekilli organizmalarla ilişkilendirilmiştir.⁸ *Pseudomonas aeruginosa* 1882 yılına kadar saf kültürde tam olarak izole edilememiştir. Carle Gessard 1882 yılındaki sargı bezlerindeki mavi ve yeşil renk değişikliğiyle ilgili bir yayınında iki hastanın mavimsi-yeşil cerahatlı kutanöz yarasındaki organizma üremesini bildirmiştir. *Bacillus pyocyaneus* isimlendirmesini 1882 yılında Gessard yapmıştır.⁹ Bunu izleyen çeşitli yayınlarda *P. aeruginosa* yara örneklerinde mavi-yeşil cerahat toplanmasına neden olan ajan olarak tanımlanmıştır.¹⁰

P. aeruginosa'nın bir enfeksiyon etkeni olarak yetişkin kanından izolasyonu Brill ve Libman tarafından 1889 yılında yapılmıştır. Patojen bir bakteri olarak tanımlayanlar ise; Hitschman ve Kreibich (1897), Frenkel (1917) ve Osler (1925) olmuştur.^{11,12} 1916 yılındaki daha ayrıntılı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın invazyonu ve yayılımı sonucunda meydana gelen akut ve kronik enfeksiyonlardan bahsedilmiştir.¹³

Pseudomonas (Yunanca: 'pseudes' , sahte; 'monas' , ünite) cinse özgü ismini 1990 yılında Migula vermiş ve *P. pyocyanea* olarak isimlendirmiştir. Aeruginosa ise (Latin: aeruginosus) yaygın olarak kullanıldıktan sonra şu an tür ismi olarak kabul edilmiştir.^{14,15}

2.2. GENEL TANIMLAMA VE SINIFLANDIRMA

Pseudomonas cinsi bakteriler *Pseudomonadaceae* ailesinin bir üyesidir. Dooren de Jong *Pseudomonas* türlerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı bileşiklerin reaksiyonlarına dayalı fenotipik özelliklere göre sınıflandırmıştır.¹⁶ Palleroni ve ark. rRNA-DNA homoloji çalışmalarına göre Pseudomonasları beş ribozomal RNA homoloji grubuna ayırmışlardır. Gilardi ise pseudomonasları fenotipik özelliklerine göre yedi gruba ayırmıştır; fluorescent, stutzeri, alcaligenes, pseudomallei, acidovorans, facilis-delafieldi ve dimunata.¹⁷

Tablo 1. Klinik önemi olan bazı Pseudomonasların sınıflandırılması

rRNA Homoloji Grup ve Subcins ve Tür Adları	
Floresan veren grup (rRNA grup I)	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> <i>P. cholororaphis</i> <i>P. cichorii</i> <i>P. syringae</i> <i>P. viridiflava</i> <i>P. flavescens</i>
Floresan vermeyen grup (rRNA grup I)	<i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. luteola</i> <i>P. oryzihabitans</i>
rRNA grup II	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia picketti</i>
rRNA grup III	<i>Comamonas türleri</i> <i>Acidovorax türleri</i>
rRNA grup IV	<i>Brevundimonas türleri</i>
rRNA grup V	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>

Kaynak: Collier L, Balows A, Sussman M. (1997). Introduction to the aerobic *Pseudomonas*. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed, Vol 2, Systematic Bacteriology, p.1091-1108.

Pseudomonas türü bakteriler gram negatif, sporsuz, aerobik, nonfermentatif, 0.5-0.8 µm genişliğinde, 1.5-3.0 µm uzunluğunda, düz veya hafif kıvrımlı basillerdir. Bazı izolatlar anaerob ortamda da üreyebilirler. Pseudomonas türleri katalaz pozitif olup, *P. luteola* ve *P. oryzyhabitans* dışında klinik öneme sahip çoğu tür oksidaz pozitifdir.¹

2.3. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ:

2.3.1. Koloni

Pseudomonas türlerinin asgari besin ihtiyacı olduğundan %5 Koyun kanlı triptik soy veya Columbia agar, Çikolata agar ve MacConkey agar gibi katı besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. *P. aeruginosa* uygun besiyerinde optimum 35 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında ürer. Aynı zamanda 42 °C'de de üreyebilirler fakat +4 °C'de üreyemezler. *P. aeruginosa*'nın 42°C'de üreyebilme özelliği karakteristiktir. Floresans Pseudomonaslardan *P. fluorescens* ve *P. putida* 37 °C'de zayıf üremektedir ve aynı zamanda +4 °C'de de üreyebilmektedir.^{1,14}

P. aeruginosa izole edildikleri besiyerlerine yayılan pigmentleri, koloni morfolojisi ve üzüksü kokusuyla kolaylıkla tanınır. Kolonileri genellikle düz ve yayılmış yapıda olup, kenarları düzensizdir. Otolize bağlı olarak metalik bir refle görülebilir. Düzgün, mukoid ve cüce (koloni varyantı) gibi değişik koloni morfolojileri görülebilir. Özellikle Kistik Fibrozlu (KF) hastalardaki mukoid *P. aeruginosa* suşları ile kronik pulmoner kolonizasyon arasındaki ilişki yıllar önce tanımlanmıştır.^{1,18}

2.3.2. Pigment

P. aeruginosa izolatlarının çoğu mavi renkli bir pigment olan piyosiyenin üretirler. Suda çözünen fenazin türevi bir kimyasal madde olan piyosiyenin solunum yolundaki siliyer hücre fonksiyonlarını bozar, serbest radikal birikimine ve doku hasarında artışa neden olur.¹⁹ Piyoverdin (floresans), *Pseudomonadaceae* ailesinin floresans grubunu oluşturan bakteriler tarafından üretilir. Piyoverdin sarı-yeşil veya sarı-kahverengi renkte olup, suda çözünen ve UV altında floresans veren bir

pigmenttir. Piyoverdin, floresans vermeyen mavi renk pigmentli piyosiyanınle birleşince *P. aeruginosa*'nın karakteristik parlak yeşil rengi meydana gelmektedir. Bu pigmentler Fe^{+3} 'ün aktif transportunda rol oynayan sideroforlar olarak da görev yaparlar. Dolayısıyla düşük demir konsantrasyonu içeren kültür ortamları gibi bakterinin demir alımının kısıtlı olduğu durumlarda pigment üretimi artar.¹

2.4. PATOGENEZ

P. aeruginosa hem invaziv hem de toksijenik etkili olması nedeniyle enfeksiyon patogenezi de çeşitli olan bir bakteridir. *P. aeruginosa* enfeksiyonu üç aşamada gelişir; kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım. Kolonizasyonda virülans faktörleri, konağın immün direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları bakterinin yayılmasını kolaylaştıran önemli etkenlerdir. Kolonize olan bakteri sistemik enfeksiyona ilerleyebilir.^{6,20,21,21}

Konak savunması tam olan kişiler ciddi *P.aeruginosa* enfeksiyonları açısından bir risk altında değil iken, kandaki nötrofil sayıları ciddi boyutta düşük olan kişiler (örneğin kanser nedeniyle kemoterapi alan hastalar) invaziv enfeksiyonlar açısından risk altındadırlar. Yanık hastaları dermal tabaka hasara uğradığından invaziv hastalık açısından risk altında iken, mekanik ventilasyon altındaki hastalar normal mukosilier aktivite bozulduğundan pnömoni açısından risk altındadırlar.¹

2.4.1. Virulans faktörleri

Polisakkarit kapsül; glikokaliks, ekzopolisakkarit veya aljinat olarak adlandırılır. β -1,4 ile bağlı D-mannuronik asit ve L-glukuronik asitten oluşur. Bu yapının oranına göre vizkozitenin derecesi değişir ve mukoid koloni görünümü de bu oranla ilişkilidir.¹⁴ Hem adezyon faktörü hem de antifagositer olarak işlev gören kapsül, aynı zamanda da immunojeniktir. Bakterinin epitel hücre yüzeylerine tutunmasını sağlar. Biyofilm oluşturarak bakteriyi vücudun immün sisteminden ve antibiyotik etkisinden korur.^{17,21}

Pili; organizmanın konak epitelyal hücre yüzeyindeki GM-1 gangliozyd reseptörlerine tutunmasını sağlayan yüzey uzantılarıdır. Pililer en önemli adherans faktörüdür.^{17,22}

Lipopolisakkarit; *P. aeruginosa*'nın ürettiği endotoksin olup ateş, şok, oliguri, lökopeni veya lökositoz, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) ve metabolik değişikliklerle karakterize septik şok sendromuna sebep olur.¹⁷ *Enterobacteriaceae*'deki lipopolisakkaritle karşılaştırıldığında *P. aeruginosa*'daki daha az toksisiteye sahiptir. İnsan serumundaki kompleman aracılı bakterisidal olaylardan hücreyi korumada büyük rolü vardır. Klinik örneklerdeki *P. aeruginosa* izolatlarının çoğu seruma dirençlidir ve bu dirence en sık kandan izole edilen suşlarda rastlanılır.¹⁴ Bu organizma liposakkarid yapısındaki polisakkarid O yan zincirini kaybederse, komplemana duyarlı hale gelir ve invazif enfeksiyon, bakteriyemi oluşturabilme özelliğini kaybeder.¹⁸

Elastaz; elastin içeren dokularda hasara, immünglobulin yıkımına neden olur ve nötrofil kemotaksisini engeller. Hemorajik lezyonlar yaparak karakteristik deri bulgusu olan ektima gangrenozuma neden olur.¹⁷

Hemoliziner; *P. aeruginosa*'da iki farklı hemolizin tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi ısıya duyarlı Fosfolipaz C'dir. Sürfaktanı parçalayarak pulmoner ateletaziye neden olur, opsoninleri inaktive eder. Isıya dayanıklı glikopeptid olan Rhamnolipid ise solunum yolundaki silier aktiviteyi baskılar. Siliyer aktiviteyi azaltarak alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur.⁶ Lesitin içeren dokuları parçalayan bu iki hemolizin sinerjistik hareket ederek doku invazyonuna yardımcı olurlar.¹⁸

Ekzotoksin A; hücre dışı bir enzim olup önemli bir virulans faktörüdür. Hücre içi etki mekanizması difteri toksinine benzer. Protein sentezini inhibe eder ve doku yıkımı yapar. Makrofaj cevabını engeller, bağışıklığı baskılar.^{13,17}

Ekzoenzim S; protein sentezini inhibe eder. Bakteri yayılmasını ve invazyonunu kolaylaştırır.¹⁷

Nörominidaz; GM-1 gangliozyd reseptörlerinden sialik asidi uzaklaştırarak pilinin bağlanmasını kolaylaştırır.¹⁷

Lökosidin; sitopatik etkisinden dolayı lökosidin olarak adlandırılır. Nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını bozar ve akut akciğer hasarında rol alır.^{17,19}

Piyosiyanın; solunum yolundaki silier aktiviteyi bozar ve özellikle akciğer gibi oksijenize dokularda oksidatif hasara neden olur. Piyosiyanın *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'un da içinde bulunduğu çoğu tür için bakterisidal özellik gösterir.¹³

Enterotoksin; normal gastrointestinal aktiviteyi engelleyerek diyareye neden olur.¹⁷

2.4.2. Klinik Olarak Etken Olduğu Enfeksiyonlar

2.4.2.1. Solunum sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa, kronik akciğer hastalarında ve bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde akut, hayatı tehdit edici, bakteriyemik veya non-bakteriyemik pnömoniye neden olur. Primer (non-bakteriyemik) pnömoni, hastane ortamıyla karşılaşan özellikle yoğun bakım biriminde yatıp solunum cihazlarına bağlı ve antibiyotik kullanılan kronik akciğer hastalığı veya kalp yetmezliği olan kişilerde sıklıkla ortaya çıkar. Bakteriyemik pnömoni çoğunlukla kanser kemoterapisinden sonra nötropenik hastalarda ortaya çıkar.²³

2.4.2.2. Kistik fibroz

KF'lu hastalarda *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları yaşla birlikte artan oranda alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olur. Bu oran bir yaşın altında %21 iken 26 yaşın üzerinde %80'e kadar çıkar. *P. aeruginosa* progresif akciğer enfeksiyonu oluşmasında kritik bir role sahiptir. *P. aeruginosa* enfeksiyonu geçirenlerde KF'un akciğer hastalığı daha ağır seyirli olup progresyon göstermektedir.²³

2.4.2.3. Bakteriyemi

Fokal bir enfeksiyon odağı olmadan bakterinin kanda bulunması primer bakteriyemi olarak tanımlanır. İmmun sistemi baskılanmış konaklarda sıklıkla primer bakteriyemi ortaya çıkar. *P. aeruginosa* bakteriyemisinde, diğer gram negatif bakterilerle oluşan bakteriyemilerden farklı olarak sarılık ve ektima gangrenozum gibi patognomonik deri lezyonları görülür.²³

2.4.2.4. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa menenjit veya beyin apsesine de neden olur. *P. aeruginosa* kanserli hastalarda görülen menenjitin *Listeria monocytogenes*'den sonra en sık ikinci etkidir. Aynı zamanda beyin apsесinin de *E. coli*'den sonra en sık etkidir. *P. aeruginosa*'ya bağlı gelişen menenjitte bakteriyemi varsa akut ve fulminan bir gidiş söz konusudur.²³

2.4.2.5. Endokardit

P. aeruginosa'nın neden olduğu enfektif endokardit bu patojenin ilaç bağımlılarında doğal kapağa ve diğerlerinde de prostetik kalp kapağına yerleşimiyle meydana gelir. Bakterinin kan akımından direkt invazyonla veya eroin ile birlikte karıştırılan maddelerin yol açtığı subendotelyal hasar sonucu oluşan yeni damarlar ile endokardiyuma ulaştığı düşünölmektedir.²³

2.4.2.6. Kulak enfeksiyonu

P. aeruginosa normal kulakta nadiren bulunur fakat yaralanma, maserasyon, inflamasyon ve nem varlığında dış kulak yolunda sıklıkla yerleşir. Yüzmeyle bağlantılı iyi seyirli eksternal otit gibi akut enfeksiyonlara neden olabildiği gibi malign eksternal otit gibi kronik ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kulak enfeksiyonlarından bir diğeri otitis media'dır. Kronik süpüratif otitis media olan çocuk ve yetişkinlerde orta ve dış kulak yolundan en sık izole edilen bakteriyel patojen *P. aeruginosa*'dır.^{23, 24}

2.4.2.7. Göz enfeksiyonları

P. aeruginosa bakteriyel keratitin en sık etkenlerinden biridir. Bakteri, trakeobronşiyal epitelde olduğu gibi, sialik asid (N-asetil nörominik asid) spesifik reseptörü aracılığıyla oküler epitele bağlanır. Pseudomonas keratiti risk faktörleri arasında; kontakt lens kullanımı, ağır yanık, koma, önceden göz radyasyonu almış, yoğun bakım biriminde yatan ve Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS) olan hastalar vardır. Kırksekiz saat içinde bütün korneayı kaplayarak perforasyona gidebilir.²³

2.4.2.8. Kemik ve eklem enfeksiyonları

Pseudomonas kemik ya da eklem enfeksiyonu çocuklarda, yaşlılarda, kronik bir hastalığı olan ya da altta yatan hastalığı olan kişilerde görülür. Daha çok çocuklarda tanımlanan bir diğer enfeksiyon, ayaktaki ufak delici yaralardan sonra gelişen osteokondrittir ve *P. aeruginosa* en sık saptanan etkindir.²³

2.4.2.9. Üriner sistem enfeksiyonu

P. aeruginosa'ya bağlı gelişen üriner sistem enfeksiyonları genellikle kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenli ve iatrojeniktir. Üriner sistem, Pseudomonas bakteriyemilerinde %40 gibi yüksek oranda primer odağı oluşturur.²³

2.4.2.10. Gastrointestinal enfeksiyonlar

Enfeksiyon en sık yenidoğanlarda ve hematolojik malignitede kemoterapiye sekonder nötropeni gelişen hastalarda ortaya çıkar. *P. aeruginosa* yenidoğanda ve nötropenik hastalarda görülen fatal seyirli olabilen nekrotizan enterokolitte primer etkindir. Lösemi hastalarında görülen tiflit çekumda nekroz ve gangren ile giden lokal bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyonda da *P. aeruginosa* en sık izole edilen bakteri olmasına karşın diğer bakteriler de etken olabilir.²³

2.4.2.11. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Dekübitis ülserleri, dermatit, yanık veya travma ile bütünlüğü bozulmuş deride, nem de varsa primer diffüz veya lokalize Pseudomonas deri lezyonları meydana gelebilir. Pseudomonas bakteriyemisi sırasında ektima gangrenozum adı verilen deri lezyonları dışında subkutan nodüller, derin apseler, selülit, veziküler ve püstüler lezyonlar, bül veya nekrotizan fasiit gelişebilir.²³

2.5. ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ

P. aeruginosa birçok antimikrobiyal ilaç grubuna karşı doğal dirençlidir. Bunun yanında kromozomal mutasyonlarla veya plazmidler, transpozonlar veya integronlar aracılığıyla birçok antibiyotiğe karşı kazanılmış ileri direnç

mekanizmaları geliştirebilmektedir. Hem doğal dirence hem de kazanılmış direnç mekanizmaları geliştirebilmesine bağlı olarak bu enfeksiyonların tedavisi çoğu zaman zordur. *P. aeruginosa*'da, bakteriyel dirençte bilinen ve çoğu kez aynı anda bulunan birçok enzimatik ve mutasyonel mekanizma bulunmaktadır.^{1,4}

2.5.1. Kazanılmış Direnç Mekanizmaları

P. aeruginosa izolatları β -laktamlara ve aminoglikozidlere karşı kazanılmış direnç geliştirir fakat florokinolonlara karşı kazanılmış direnç geliştirmez. *P. aeruginosa* izolatları arasındaki florokinolon direnci sadece kromozomal genlerle bağlantılıdır ve florokinolon hedefleri DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) ve/veya topoizomerez IV'deki (*parC* ve *parE*) mutasyonel değişikliklerle ve/veya çoklu ilaç atım pompalarının aşırı ekspresyonuyla olabilir.⁴

β -laktamlara kazanılmış dirençte β -laktamları inaktive edebilen enzim üretimi gerekir. *P. aeruginosa*'da enzim yapımı β -laktam antibiyotiklere kazanılmış dirençte başlıca mekanizmadır. β -laktamazlar olarak adlandırılan penisiloin-serin transferazlar, β -laktam halkasındaki amid bağı kırarlar ve antibakteriyel aktivitesi olmayan ürünler elde edilir.⁴ *P. aeruginosa* izolatları arasında en sık aktarılan β -laktamazlar; moleküler sınıf A serin β -laktamazların (PSE, CARB, ve TEM aileleri) üyesi olan penisilinazlardır. Bu gruptaki PSE ailesinin üyesi olan enzimlere daha sık rastlanmaktadır.²⁵ Bu penisilinazların terapötik etkisi kısmen sınırlı olduğundan genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin, monobaktamların veya karbapenemlerin klinik yararlanımına etki etmezler. Daha az sıklıkta olsa da sınıf A genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, *P. aeruginosa* suşlarında da tespit edilmiştir ve TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, ve IBC ailelerinden enzimler içermektedirler.^{26,27,28,29,30,31,32,33} *P. aeruginosa*'daki TEM ve SHV tipi GSBL (genişlemiş spektrumlu beta laktamaz)'lerin genleri gen transferiyle geçen genlerdir ve muhtemelen *Enterobacteriaceae* ailesinden köken almıştır.⁴

PER-1, *P. aeruginosa*'da ilk tanımlanan GSBL'dir ve *P. aeruginosa*'ya özgüdür. Günümüzde Türkiye'deki nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatları arasında *bla_{PER-1}*'in yaygın olduğu bildirilmiştir.⁴ Bulgaristan'da 2007 yılında seftazidim dirençli nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında VEB-1 GSBL'de yüksek yayılım bildirilmiştir.⁴ VEB enzimlerinin substrat profilleri PER-1 ile aynıdır. 20. yüzyılın

sonlarında Guayana geniş spektrumlu (GES) olarak adlandırılan GSBL'lerin yeni bir ailesi tanımlanmıştır. Yakın zaman önce ise Belçika'da Ambler sınıf A da BEL-1 olarak adlandırılan yeni bir GSBL tipi tanımlanmıştır.⁴

Karbapenemi parçalayan karbapenemazlar veya MBL olarak da bilinen enzimler *P. aeruginosa*'daki GSBL'lerin diğer grubunu oluştururlar.⁴ *P. aeruginosa*'daki ilk sınıf B metallo- β -laktamaz 1991 yılında Japonyada tanımlanmıştır.³⁴ Bundan sonra *P. aeruginosa* izolatlarındaki metallo β -laktamazlar nerdeyse dünyanın bütün bölgelerinden izole edilmiştir^{35,36,37} ve dört büyük aile tanımlanmıştır; IMP, VIM, SPM ve GIM aileleri.^{38,39,40,41,42} Yakın zaman önce *Klebsiella pneumoniae* Karbapenemaz (KPC) ailesinin sınıf A karbapenemazları tanımlanmıştır. KPC üreten *P. aeruginosa* izolatu ilk olarak 2007'de Kolombiya'da izole edilmiştir.⁴³ Daha sonraki yayınlarda KPC genlerinin klonal yayılım gösterdiği bildirilmiştir.⁴⁰ *P. aeruginosa*'da ilk tanımlanan kazanılmış OXA-tipi karbapenemaz 2008'de rapor edilmiştir ve *A. baumannii*'de önceden tanımlanan OXA-40 karbapenemazla aynı olduğu gösterilmiştir.⁴⁴

Sınıf A GSBL kodlayan genlerin yaygınlığı antibiyotik direncinde önemli bir rol oynar ve *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu hayatı tehdit eden infeksiyonların tedavisindeki antibiyotik seçiminde imkanları kısıtlayabilir. Plazmidler ve integronlar bu yayılımda önemli faktörlerdir. *P. aeruginosa*'daki TEM ve SHV enzimlerini kodlayan genlerin çoğunda da plazmid lokalizasyonu gösterilmiştir. Ambler sınıf B (metalloenzimler) ve Ambler sınıf D (oksasilinazlar)'daki β -laktamazları kodlayan genler genellikle sınıf 1 integronlarda lokalize olur.⁴ Sınıf D'deki genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardan OXA-tipi enzimlere *P. aeruginosa*'da da rastlanılmıştır.⁴⁵ Geniş spektrumlu oksasilinazların çoğu plazmid veya integron yerleşimli genlerle kodlanır ve bu özellik kolay yayılmalarına ve sınıf D GSBL'lerin artmış prevalansına katkıda bulunur.⁴

Aminoglikozidler için kazanılmış direnç genellikle ilaç molekülünün kimyasal modifikasyonla enzimatik inaktivasyonu olur. Aminoglikozid modifiye edici enzimler (AMEs), antibiyotik molekülüne fosfat, adenil veya asetil radikali bağlar ve böylece modifiye edilen antibiyotiğin bakteri hücrelerinde hedefe (30S ribozomal alt ünite) bağlanma affinitesini azaltırlar. AMEs plazmid kaynaklıdır ve üç sınıfa ayrılırlar; aminoglikozid fosforiltransferazlar (APH), aminoglikozid

adeniltransferazlar (nükleotidil transferaz-AAD veya ANT olarak da bilinir) ve aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC).⁴ *P. aeruginosa*'nın sıklıkla eksprese ettiği AMEs'ler; AAC (6')-II (gentamisin, tobramisin ve netilmisine direnci belirler), AAC (3)-I (gentamisine direnç), AAC (3)-II (gentamisin, tobramisin ve netilmisine direnç), AAC (6')-I (tobramisin, netilmisin ve amikasinine direnç) ve ANT (2')-I (gentamisin ve tobramisine direnç). Bu ailedeki spesifik enzimlerle farklı farklı aminoglikozidler inaktive edilse de *P. aeruginosa*'nın çoklu aminoglikozid inaktive eden enzim genlerini taşıyabilme yeteneği, bütün aminoglikozidlere direnç potansiyeli olan suşların gelişimini sağlar.⁴

Çeşitli aminoglikozid modifiye eden enzimlere ek olarak, yüksek düzey çoklu aminoglikozid direnci 16S rRNA'nın metilasyonu ile da bağlantılı olabilir. 16S rRNA'nın metilasyonu, *Enterobacteriaceae* ailesine ait gram negatif patojenler arasında ve *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri gibi nonfermentatif bakteriler arasında aminoglikozidlere karşı yeni bir direnç mekanizması olarak yakın zaman önce gösterilmiştir.⁴⁶ RmtA olarak adlandırılan ilk 16S rRNA metilaz 2003 yılında Japonya'da aminoglikozid dirençli bir *P. aeruginosa* klinik izolatında bildirilmiştir.⁴⁷

Günümüzde *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* klinik izolatları arasında dünya genelinde bulunmuş olan beş ribozomal metiltransferaz enzimi (RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, ve ArmA) tanımlanmıştır.^{48,49,50,51,52,53} Metiltransferazlar, aminoglikozid modifiye eden enzimler kadar yaygın gibi görülmeseler de bu enzimleri kodlayan genlerin tümünün mobil genetik elemanlarla ilişkili olması, *P. aeruginosa* ve diğer gram negatif basiller arasında yayılımıyla ilgili endişe uyandırmaktadır.^{43,44}

2.5.2. Kromozomal Kaynaklı Direnç Mekanizmaları

Kazanılmış direnç mekanizmalarına benzer olarak, *P. aeruginosa* kromozomu üzerinde çeşitli direnç mekanizmaları kodlanmaktadır. Bu mekanizmalar arasında çeşitli aminoglikozid inaktive eden enzimler⁵⁴ ve bir sınıf D oksasilinaz olan OXA-50⁵⁵ vardır. *P. aeruginosa* izolatları arasındaki kromozomal genlerle sınırlı olan tanımlanmış florokinolon direnç mekanizmaları arasında hedef mutasyonları ve aktif atım da vardır. Diğer gram negatif bakterilerdeki duruma benzer olarak, *P. aeruginosa*'da DNA giraz (Topoizomeraz II) florokinolonların öncelikli hedefidir.⁵⁶ O yüzden ilk hedefe özel mutasyonlar, tipik olarak *gyrA*'nın kinolon

direncini belirleyen bölgesinde (quinolone resistant determinative region-QRDR) gözlenir. Hem *gyrA* hem de topoizomeraz IV geni *parC*'nin QRDR'sinde mutasyonu olan suşlarda yüksek düzeyde direnç gözlenmiştir.^{57,58,59} Diğer iki gen; *gyrB* ve *parE*' de mutasyonel değişiklikler tanımlansa da bu mutasyonların prevalansı daha düşüktür.⁵⁸

2.6. DİRENÇ MEKANİZMALARI

2.6.1. OprD İlişkili Direnç

Gram negatif bakterilerin dış membranı, antibiyotiklerin penetrasyonunu yavaşlatan yarı geçirgen bir bariyer oluşturur ve *P. aeruginosa*'nın dış membranı *E.coli*'nin dış membranının sadece %8'i kadar geçirgendir.⁶⁰ Bununla birlikte *P. aeruginosa*'nın hayatta kalabilmesi için besin maddeleri hücre içine geçebilmelidir. Bunun için besin maddelerinin porin adı verilen su dolu protein kanalları içinden geçmesi gerekmektedir.

P. aeruginosa genomunun dizi analizinde 163 dış membran proteini saptanmış, bu dış membran proteinlerinin 64'ü üç porin ailesine gruplandırılmıştır. Bu porinlerin şeker, aminoasit, fosfat, iki değerli katyon ve sideroforların transportunda önemli fizyolojik rolü vardır.⁶¹ Aynı zamanda β -laktam, aminoglikozid, tetrasiklin ve bazı florokinolonlar gibi çeşitli hidrofilik antibiyotiklerin porin kanalları aracılığıyla dış membranı geçtikleri gösterilmiştir.^{61,62} *P. aeruginosa* söz konusu porin kanallarının kaybıyla belli antibakteriyel ajanlara duyarlılığını azaltabilmektedir.⁴

P. aeruginosa'nın OprD porini, substrata spesifik bir porindir. Bu porinin, temel aminoasitlerin ve bu aminoasitleri içeren küçük peptidlerin ve karbapenemlerin hücre içine difüzyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir.⁶³ Bu su dolu porin, *E.coli*'deki nonspesifik porin OmpF'ye yakın homoloji gösterir. *P. aeruginosa* suşlarında *oprD*'nin genetik dizisi ve OprD'nin aminoasit dizisinin farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu değişimin bazı çalışmalarda nükleik asit benzerlikleri için %91-%93 arasında, aminoasit dizi benzerliği için %83-93 arasında olduğu ifade edilmiştir. Bu durum türler arası rekombinasyon olayı ile açıklanmaktadır.⁶⁴

OprD ilişkili direnç, *oprD* transkripsiyonel ekspresyonunda azalma ve/veya dış membrandaki fonksiyonel bir porinin translasyonel yapımında bozulmaya yol açan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. *oprD* transkripsiyon düzeyinde tanımlanan mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır.

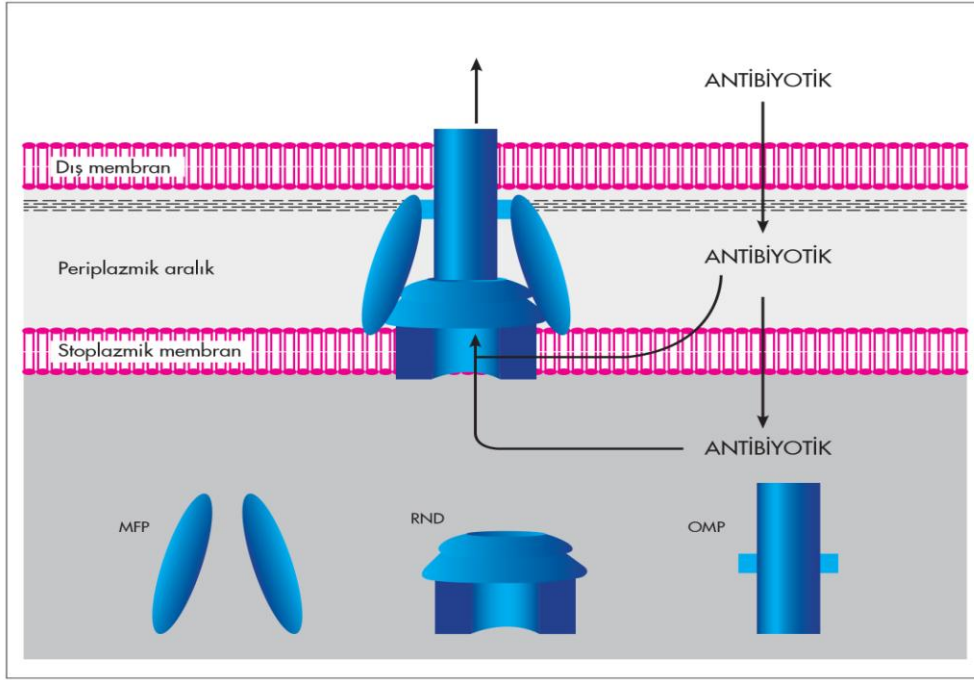
- i- *oprD* promoterin (başlatıcı) aksaması
- ii- *oprD* transkripsiyonunun erken sonlanması
- iii- eser metallerin direnç mekanizmalarıyla birlikte düzenleme
- iv- salisilat aracılı azalma
- v- MexEF-OprN atım pompasıyla birlikte düzenlenen mekanizmalar aracılığıyla transkripsiyonel ekspresyonun azalması.⁵

2.6.2. Atım Aracılı Direnç

Hücre içine ilaç girişinde OprD gibi proteinlerin kaybı aktif bir bariyer görevini görürken membran ilişkili pompalarla yapılan aktif transport aracılığıyla da hücre içi ilaç birikiminde bir azalma sağlanır. Atım pompaları; aminoasit dizi benzerliği, dışarı atımı sağlamak için gerekli olan enerji kaynağı ve farklı pompaların substrat spesifitelerine bağlı olarak beş üst aileye ayrılır. Üst aileler;

- i. ATP bağlayan kaset / “ATP binding cassette” (ABC) ailesi
- ii. “Small multidrug resistance” (SMR) ailesi
- iii. “Major facilitator superfamily” (MFS) ailesi
- iv. “Resistance-nodulation-division” (RND) ailesi
- v. “Multidrug and toxic compound extrusion” ailesi

P. aeruginosa genomunun dizi analizinde beş üst aileden atım sistemleri gösterilmekle birlikte pompaların çoğu RND ailesine aittir ve bu ailede de toplam 12 RND sistemi vardır.⁵



Şekil 1: *P. aeruginosa*'daki RND atım pompalarının yapısı ve fonksiyonu

RND pompaları tipik olarak; bir periplazmik membran füzyon proteini (MFP), bir dış membran faktörü (OMF) ve bir stoplazmik membran transport proteininden (RND) meydana gelen üçlü bir sistemden oluşur. Bu bileşik bütün membranı kapsayan bir kanal oluşturarak lipofilik ve ampifilik ilaçların periplazmik aralık ve stoplazmadan hücre dışına transportunu sağlar. Bu pompaları kodlayan genler *P. aeruginosa* kromozomu üzerindeki operonlara yerleşmişlerdir.⁵

Her operon MFP ve RND transport proteinlerini kodlayan en az iki genden oluşur. 12 operonun altı tanesinde üçlü sistemi tamamlayan OMF geni varken diğer operonlarda OMF geni yoktur. Bazı operonların yanında operonun aynı veya farklı bölgesinde transkribe edilen düzenleyici genler vardır ve bunlar pompa ekspresyonunun aktivatörü veya baskılayıcısı olarak görev alırlar. Operonlar bu genlerin dışında başka ilave ek genler içerebilirler. Örneğin *mexGHI-opmD* operonundaki *mexG*, bir integral membran proteini kodlar ve PA2528-PA2527-PA2526-*opmB*'de ikinci bir RND transport protein geni (PA2526) vardır.⁵

P. aeruginosa'daki 10 RND pompası; MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OpmE, MexMN ve TriABC olarak adlandırılır (Tablo 2). Mex; çoklu atım (multiple efflux), Tri; triklozan atım (triclosan efflux) kelimelerinin temsili kısaltmaları olarak

kullanılır. Bu pompaların bazılarının substratları ortak iken kendi ekspresyonlarına özgü benzersiz fenotiplere de sahiptirler. Bu pompaların substratları antibiyotikler, biosidler, boyalar, deterjanlar, organik çözücüler, aromatik hidrokarbonlar ve homoserin laktonlardır^{65,66}(Tablo 2).

P. aeruginosa'daki bu pompaların antimikrobiallere karşı koruyucu etkisinin yanında hücreden hücreye iletişim ve patojenite gibi fizyolojik bir rolü de vardır.⁶⁷ *P. aeruginosa* eksopolisakkarit bir matriksle örtülü bir topluluk olarak yaşayabilirken son zamanlardaki çalışmalar RND atım pompalarının tipik antipseudomonal ajanlara dirençte biofilm oluşumuna katkıda bulunmadığını ileri sürmektedir.⁶⁸

Tablo 2. *P. aeruginosa*'daki RND atım pompalarının özellikleri

Operon	Komponent	Fonksiyon	Regulator		Substratlar		
			primer	sekonder	Antibiyotikler	Ek bileşikler	
<i>mexAB-oprM</i>	MexA	MFP	MexR	NalC	Florokinolonlar,β-laktamlar ve β-laktamaz inhibitörleri, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, novobiyosin, trimetoprim ve sulfonamidler	Biyosidler (ör/triklosan), deterjanlar, boyalar,HSL, aromatik hidrokarbonlar	
	MexB	RND	NalD				
	OprM	OMF					
<i>mexCD-oprJ</i>	MexC	MFP	NfxB		Floroinolonlar, β-laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklin, novobiyosin, trimetoprim ve makrolidler	Biyosidler (ör/triklosan), deterjanlar, boyalar, aromatik hidrokarbonlar	
	MexD	RND					
	OprJ	OMF					
<i>mexEF-oprN</i>	MexE	MFP	MexT	MexS	Floroinolonlar, kloramfenikol, trimetoprim	Biyosidler (ör/triklosan), aromatik hidrokarbonlar	
	MexF	RND		MvaT			
	OprN	OMF					
<i>mexXY</i>	MexX	MFP	MexZ		Floroinolonlar, β-laktamlar, tetrasiklin, aminoglikozidler makrolidler ve kloramfenikol		
	MexY	RND					
	OprM/Opm	OMF					
<i>mexJK</i>	MexJ	MFP	MexL		Tetrasiklin, eritromisin	Biyosidler (ör/triklosan),	
	MexK	RND					
	OprM/OpmH	OMF					
<i>mexGHI-opmD</i>	MexG	?	SoxR		Floroinolonlar		
	MexH	MFP					
	MexI	RND					
	OpmD	OMF					
<i>mexVW</i>	MexV	MFP			Floroinolonlar, Tetrasiklin eritromisin ve kloramfenikol		
	MexW	RND					
	OprM	OMF					
<i>mexPQ-opmE</i>	MexP	MFP			Floroinolonlar, Tetrasiklin makrolidler ve kloramfenikol		
	MexQ	RND					
	OpmE	OMF					
<i>mexMN</i>	MexM	MFP			Kloramfenikol, tiamfenikol		
	MexN	RND					
	OprM	OMF					
<i>triABC</i>	TriA	MFP				Trikozian	
	TriB	MFP					
	TriC	RND					
	OpmH	OMF					

Kaynak: Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, p.582–610.

2.6.2.1. MexAB-OprM Atım Pompası

P. aeruginosa'daki ilk çoklu ilaç atım pompası olan MexAB-OprM, siderofor aracılı demir transportunun incelendiği bir çalışma sırasında, Poole ve ark. tarafından bulunmuştur.⁶⁹ MexAB-OprM atım pompası; florokinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, β -laktamlar, β -laktamaz inhibitörleri, makrolidler, novobiyoisin, trimetoprim ve sulfonamidler gibi farklı sınıflardaki ilaçların hücreden dışarı atılmasını sağlamaktadır.⁵ RND atım pompalarından MexAB-OprM, β -laktam sınıfında en geniş substrat profiline sahiptir; karboksipenisilin, aztreonam, geniş spektrumlu sefalosporinleri (seftazidim ve sefotaksim), penemleri (faropenem) ve karbapenemlerden meropenemi ve panipenemi (imipenem ve biapenem hariç) dışarı atabilme özelliğindedir. MexAB-OprM, sokak suşu (wild type) hücrelerde yapısal üretim aracılığıyla yukarıda bahsedilen ajanlara karşı *P. aeruginosa*'nın intrensek direncine katkıda bulunur.⁶⁶ *mexAB-oprM*'nin yalnız veya diğer direnç mekanizmaları ile kombinasyonlarıyla ilgili çalışmalarda intrensek dirençte pompaların rolü doğrulanmıştır.^{70,71,72}

mexAB-oprM operonunun ekspresyonunu çeşitli düzenleyici gen bölgeleri etkilemektedir. *mexR* geni direkt akış yukarısında (upstream) lokalizedir. Fakat *mexAB-oprM*'den farklı olarak transkribe edilir ve düzenleyici proteinlerden MarR ailesinden bir represör protein kodlar.⁷³ MexR, *mexAB-oprM* operonunun transkripsiyonunu baskılar ve kendi ekspresyonunda negatif yönde özdüzenlenim yapar (autoregulate).^{74,75} *mexAB-oprM* operonunun ikinci bir düzenleyici faktörü olan NaID, insersiyon mutasyonlarına uğrayan *naID* geniyle keşfedilmiştir.⁷⁶ NaID, TetR ailesinden bir baskılayıcıdır ve NaID, *mexAB-oprM*'nin akış yukarısında fakat *mexR* bağlanma bölgelerinin akış aşağısında bir diziye bağlanır.⁷⁷ NaID operatörü, *mexAB-oprM*'nin ikinci bir başlatıcısıyla üst üste biner ve NaID'nin bağlanması bu proximal *mexA* başlatıcısından itibaren ekspresyonu sınırlar.

2.6.2.2. MexCD-OprJ Atım Pompası

MexCD-OprJ'yi kodlayan operon 1996 yılında klonlanmış, sekanslanmış ve MexAB-OprM'ye yüksek derecede benzerliği olduğu gösterilmiştir.⁷⁸ MexCD-OprJ; florokinolonlar, β -laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklin, novobiyoisin, trimetoprim ve makrolidler gibi çeşitli antimikrobiyal ajanların hücreden dışarı atılmasını

sağlamaktadır.⁵ MexAB-OprM'den farklı olarak MexCD-OprJ'nin β -laktamlarda geniş bir substrat profili yoktur, daha doğrusu tercihen 4. kuşak sefalosporinlerin (sefepim, sefpirom ve sefozopran) hücreden dışarı atımını sağlamaktadır. *mexCD-oprJ*'nin transkripsiyonu sokak suşlarında (wild type) gözlenebilir,⁷⁹ fakat çoğunlukla tespit edilebilir seviyede protein oluşturmaya yetecek düzeyde değildir.⁷⁸ Ayrıca *mexCD-oprJ* delesyonunun, sokak suşunun duyarlılığına bir etkisi olmaması, bu pompanın intrinsek dirence katkısının olmadığını göstermektedir. *mexCD-oprJ* ekspresyonunun benzalkonyum klorid, klorheksidin glukonat, tetrafenilfosfonyum klorid, ethidyum bromid, rodamin 6G, ve akriflavin'e yanıt olarak indüklenebildiği gösterilmiş, fakat ilgili antibiyotiklere klinik yanıtta indüklenebildiği gösterilmemiştir.⁸⁰

mexCD-oprJ'nin ekspresyonu, *nfxB* geninin ürünüyle kontrol altında tutulur, bu gen *mexCD-oprJ*'nin akış yukarısında lokalizedir fakat operondan farklı olarak transkribe edilir. NfxB, *mexCD-oprJ* ekspresyonunu negatif yönde düzenler.⁷⁸

2.6.2.3. MexEF-OprN Atım Pompası

mexEF-oprN olarak adlandırılan operondaki üç açık okuma penceresi 1997 yılında tanımlanmıştır. Aminoasit dizilimleri kıyaslandığında *mexEF-oprN* ürünlerinin, MexAB-OprM ve MexCD-OprJ bileşenlerine aminoasit benzerliği gösterdiği belirlenmiştir.⁸¹ MexEF-OprN; florokinolonlar, kloramfenikol ve trimetoprimin hücreden dışarı atılmasını sağlamaktadır. Fakat pompanın kullanımda olan β -laktamlara belli bir affinitesi yoktur. *mexEF-oprN* ekspresyonu başlangıçta sessiz (quiescent) olarak bildirilmiştir fakat sonraki çalışmalarda duyarlı fenotipteki sokak suşlarında düşük düzey ekspresyon tespit edilmiştir.^{81, 82} İntrensek dirence katılmadığından sokak suşlarındaki *mexEF-oprN*'nin bozulması duyarlılığa etki etmez.⁸¹

mexEF-oprN regulasyonunda, *mexAB-oprM*'nin ve *mexCD-oprJ*'nin operon ekspresyonunu baskılayan negatif regülatör proteinler görev almamaktadır. Birçok faktör *mexEF-oprN* transkripsiyonunu kontrol edebilmektedir. Akış yukarısında lokalize ve *mexEF-oprN* ile aynı yerde transkribe edilen *mexT*, transkripsiyonel aktivatörlerin LysR ailesinden olan ve *mexEF-oprN* ekspresyonunu pozitif yönde düzenleyebilen bir protein kodlar^{83,84}. Farklı *P. aeruginosa* sokak suşlarının *mexT*

genlerindeki dizi varyasyonlarından dolayı MexT'nin aktivasyonu farklı yollar aracılığıyla olabilir. Bazı *P. aeruginosa* suşlarında kodlama bölgesinde mutasyonlar baskılandığından dolayı MexT aktif olmayan (dormant) formda bulunur. Fakat *mexT*'deki cis mutasyonları veya delesyonları inaktif MexT'yi aktif formuna dönüştürebilir.⁸⁵

Diğer suşlarda *mexT*'de baskılanan mutasyonlar yoktur, fakat MexT'nin uyarılması için efektör molekül düzeyinde potansiyel değişiklikler olması gerekir.⁸⁵ Bu suşlardaki mutasyonlar, *mexT*'nin akış yukarısında lokalize olan *mexS* geninin içinde meydana gelir. MexS'nin inaktivasyonunun MexT için efektör molekül vazifesi gören metabolitlerin yapımına sebep olduğuna inanılmaktadır. Bu da toksik metabolitleri ortadan kaldırmak için *mexEF-oprN* ekspresyonunu upregüle eder.⁸⁶ Bu yüzden bu yolda *mexEF-oprN* upregulasyonu için aktif bir MexT proteini gereklidir.

mexEF-oprN ekspresyonu, histon benzeri nükleotid düzenleyici protein ailesinin bir üyesi olan MvaT tarafından da kontrol edilir. MvaT; virulans genlerinin, housekeeping genlerin ve biofilm oluşumunda gerekli olan genlerin global düzenleyicisi olarak vazife görür.^{87,88} MvaT, DNA'ya bağlanır ve adenin-timinden (AT) zengin bölgenin karşısında yüksek bir affiniteyle oligomerleşir. Sonuç olarak belli genlerin ekspresyonu susturulur.⁸⁷ *mvaT*'nin delesyonu *mexT* veya *mexS*'ye bağımlı olmayan *mexEF-oprN* ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. MvaT, *mexEF-oprN*'nin akış yukarısına bağlanmaz.⁸⁸ Bu yüzden bu regulator proteinin kaybının *mexEF-oprN* ekspresyonunun düzenlenmesinde büyük ihtimalle indirek bir etkisi vardır.

2.6.2.4. MexXY Atım Pompası

mexXY, *P. aeruginosa* kromozomundan 1999 yılında klonlanmıştır. Pompa, MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN atım pompa sistemleriyle benzer özellikler göstermektedir.⁸⁹ Fakat diğer atım pompa sistemlerindeki operonlardan farklı olarak *mexXY*'de dış membran proteini kodlayan gen yoktur. Bunun yerine MexXY fonksiyonel bir üçlü sistem oluşturmak için OprM ile ve muhtemelen OpmB, OpmG, OpmH ve OpmI gibi diğer dış membran proteinleriyle de bağlantı kurabilmektedir.^{90,91} Florokinolonlar, spesifik β -laktamlar (Ör; sefepim), aminoglikozidler, tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisin MexXY'nin

substratlarıdır.⁹² Hücreler tetrasiklin, eritromisin, gentamisin varlığında ürettiği zaman *mexXY* ekspresyonu indüklenir. Sokak suşlarında *mexXY* delesyonu bu antibiyotiklere olan duyarlılığı artırır. Bu durum bu pompanın intrinsek dirence katkısının olduğunu düşündürmektedir. *MexXY*'nin florokinolonlara karşı intrinsek dirence katkısı yoktur. Çünkü bu ajanlar *mexXY* ekspresyonunu indükleyemezler.⁹³

Akış yukarısında lokalize olan fakat *mexXY*'de farklı yerde transkribe olan *mexZ* geni ürünü, operonun ekspresyonunu negatif yönde düzenler. *MexZ*, transkripsiyonel regülatörlerden TetR ailesine aittir ve karakteristik bir N-terminal sarmal-kıvrım-sarmal (helix-turn-helix) DNA bağlanma bölgesi içerir.⁹⁴

2.6.2.5. MexJK Atım Pompası

mexJK operonunda da OMF kodlayan gen bulunmaz, fakat üç bileşenli sistem ya *OprM* ya da *OprH*'in ilavesiyle oluşturulur. *MexJK-OprM* triklozanı hücreden dışarı atarken, *MexJK-OprM* eritromisini ve tetrasiklini dışarı atar. *mexJK*'nin sokak suşu hücrelerinde eksprese edilmediği bildirilmiştir.⁹⁵

2.6.2.6. Diğer RND Atım Pompaları

Diğer RND atım pompalarının dirence katkıları ve ekspresyonlarını kontrol eden faktörler yeni tanımlanmaya başlanmıştır. Çeşitli fenotiplerdeki klinik izolatlardaki up veya down regülasyonları yeni bildirilmektedir. *mexGHI-opmD* ekspresyonu sokak suşu hücrelerinde bulunmaktadır ve transkripsiyonel regülatörlerden *MerR* ailesine ait olan *SoxR*, redoks aktif proteininin kontrolü altındadır.^{96, 97} Norfloksasin, *mexGHI-opmD*'nin antibiyotik olarak tek substratı olarak bildirilmiştir fakat bu pompa vanadium gibi antibiyotik dışı bileşikleri de dışarı atabilmektedir. İlginç olarak *mexGHI-opmD* eksprese edebilen bir mutantta tetrasiklin ve tikarsilin-klavulanata duyarlılıkta azalma görülmüştür.⁹⁶ Diğer bir çalışmada *mexI* ve *opmD* mutantları da kanamisin, spektinomisin, karbenisilin, nalidiksit asit, tetrasiklin ve kloramfenikole duyarlılıkta azalma göstermiştir.⁹⁸ Muhtemelen *P. aeruginosa*'daki *mexAB-oprM* mutantlarında görülen *mexCD-oprJ* ve *mexEF-oprN* aşırı ekspresyonu gibi, *mexGHI-opmD*'nin kaybı, diğer RND atım pompasının aşırı ekspresyonuna neden olmuştur.⁸²

MexVW; florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisini dışarı atmak için OprM'yi ve henüz tanımlanmamış dış membran proteinlerini kullanmaktadır.⁹⁹ MexPQ-OpmE, alıcı (recipient) izolatta florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve bazı makrolidlerin MİK değerlerini yükseltmiştir. MexMN'nin OprM'nin bileşimini içeren alıcıda kloramfenikole ve tiamfenikole karşı duyarlılık azalmıştır.¹⁰⁰

TriABC, *P. aeruginosa*'da en son tanımlanan RND atım pompasıdır. *triABC*, substrat eksportunda her ikisi de gerekli olan MFB'leri kodlayan *triA* ve *triB* yönüyle diğer RND operonlarından ayrılır. OMF OpmH, TriABC ile birlikte triklosanı dışarı atabilen bir pompa oluşturur. Bu pompa için substrat olarak bir antibiyotik bildirilmemiştir.¹⁰¹

2.6.3. AmpC İlişkili Direnç

2.6.3.1. AmpC ve β -laktamlara Direnç

P. aeruginosa, *Enterobacteriaceae* ailesinin çeşitli üyelerindeki kromozomal kaynaklı AmpC'ye benzeyen indüklenebilir bir AmpC sefalosporinaz taşımaktadır. *P. aeruginosa* sokak suşları bazal seviyede AmpC üretir ve antipseudomonal penisilinlere, penisilin inhibitör kombinasyonlarına, sefalosporinlere ve karbapenemlere duyarlıdır. Fakat AmpC üretimi anlamlı derecede arttığında, *P. aeruginosa* karbapenemler hariç bütün β -laktamlara direnç geliştirir.^{102,103}

2.6.3.2. AmpC Aşırı Üretim Yolları

P. aeruginosa ve *Enterobacteriaceae* bazı üyelerindeki kromozomal kaynaklı AmpC enziminin aşırı üretimi; ya *ampC* gen indüksiyonuyla ya da yapısal yüksek düzey ekspresyona yol açan derepresyon yoluyla meydana gelir. İndüksiyon yoluyla aşırı ekspresyon, spesifik β -laktamların ve β -laktamaz inhibitörlerinin (Ör; sefoksitin, imipenem, klavulanat) kullanımı esnasında meydana gelir fakat indükleyici ajanlar ortadan kaldırıldığında geri dönüşümü olan bir süreçtir.^{104,105} Tersine, AmpC derepresyonu, indüksiyon yolunda gerekli olan proteinler kromozomal mutasyonlardan etkilendiğinde meydana gelir ve sefalosporinaz, indükleyici bir β -laktam olmadığı halde yüksek bir seviyede yapısal olarak üretilir. *P. aeruginosa* izolatları arasındaki, AmpC derepresyon fenotipleri, *Enterobacteriaceae*

arasındakilere göre daha farklıdır. *P. aeruginosa* suşları, AmpC'nin tam derepresyonu olmadan kısmi dereprese bir fenotipe geçiş yapabilir.^{106,107}

2.6.3.3. *ampC* Ekspresyonun Düzenlenmesinde Gerekli Olan Faktörler

ampC ekspresyonunun regülasyonunda gerekli olan önemli yapılar bulunmaktadır. *ampC* indüksiyonunun düzenlenmesinde üç major gen ürünü gerekmektedir. Bunlar AmpG olarak bilinen iç membran permeazı, sitozolik amidaz AmpD, transkripsiyon faktörü olan AmpR. Bu üç protein *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'nın her ikisinde de *ampC* gen indüksiyonunda gereklidir fakat AmpG'nin *P. aeruginosa*'daki *ampC* gen indüksiyon yoluyla bağlantısı gösterilememiştir.^{108,109}

Enterobacteriaceae'de AmpR, *ampC* ekspresyonunu negatif yönde düzenler.¹¹⁰ *P. aeruginosa* PAO1'nin *ampR*'si ile *ampC* ekspresyonunun direk bir analizine dayalı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'da da AmpR'nin *ampC*'nin negatif düzenleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır.¹¹¹

2.6.3.4. *ampC* İndüksiyon Mekanizması

ampC ister düşük yapısal düzeyde ister indüksiyonla artmış düzeyde eksprese edilsin, AmpR'ye bağlanan kofaktörün tipine (Ör; hücre duvarı prekursor peptidi) bağlıdır. Bu bakımdan AmpC regülasyon yolu, AmpD ve AmpR aracılığıyla hücre duvarı geri dönüşüm yoluyla yakın ilişkilidir. *P. aeruginosa* sokak suşundaki düşük bazal *ampC* ekspresyonunun düzenlenmesinde genel mekanizma, *Enterobacteriaceae*'den elde edilen verilerden tahmin edilmiştir.^{112,113,114}

AmpC indüksiyonu için penisilin bağlayan proteinlere (PBP) indükleyici bir β-laktam veya β-laktamaz inhibitörünün (Ör; sefoksitin, imipenem veya klavulanat) bağlanması gerekmektedir.¹¹⁵ Spesifik β-laktamlarla selektif AmpC indüksiyonundan sorumlu ayrıntılı mekanizmada, sonuçta stoplazmada bulunan 'baskılayıcı' UDP-pentapeptid miktarıyla karşılaştırıldığında 'indükleyici' muropeptidlerin konsantrasyonunda artış olur.^{112,113,114} AmpR'ye bağlanan baskılayıcı UDP-pentapeptidin, indükleyici muropeptid formuyla yer değiştirerek AmpR'nin yapısını değiştirdiğine inanılmaktadır. Bu yapısal değişikliğin RNA polimerazla daha hızlı bir etkileşim sağlayarak, *ampC* ekspresyonunda anlamlı bir artışa yol açtığı ileri sürülmektedir. İndükleyici β-laktam veya β-laktamaz inhibitörleri kaldırıldığında,

normal hücre duvarı sentezi ve hücre duvarı geri dönüşümü eski haline getirilir. Sonuç olarak AmpR'ye bağlı 'indükleyici' muropeptidin, şu an daha yüksek konsantrasyona ulaşmış olan 'baskılayıcı' UDP-pentapeptidle yer değişimiyle basal *ampC* ekspresyonu normal hale getirilmektedir.^{116,117}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İZOLATLARIN TOPLANMASI

Bu çalışmaya, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Kasım 2010 ve Kasım 2011 tarihleri arasında rutin olarak gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 *P. aeruginosa* suşu dahil edildi. Farklı direnç fenotiplerine sahip olan suşlar ileri çalışmalar için skim milk besiyeri (Oxoid, İngiltere) içinde -20°C'de saklandı.

3.2. İZOLATLARIN ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

Çalışmaya dahil edilen izolatlar antibiyotik duyarlılık test profillerine göre dört gruba ayrıldı. Birinci grupta çoklu ilaç dirençli 22 izolat, ikinci grupta izole karbapenem dirençli 9 izolat, üçüncü grupta yalnız karbapenem ve kinolon dirençli 7 izolat, dördüncü grupta izole kinolon dirençli 12 izolat incelendi. Birinci grup için seçilen izolatlar SENTRY sürveyans programında belirtilen kriterlere göre çoklu ilaç dirençli¹¹⁸ (seftazidim, piperasilin, imipenem, gentamisin dirençli) olarak kabul edilen izolatlar arasından seçildi. İzole karbapenem dirençli olan ikinci grup; çalışılan antibiyotikler arasında imipenem dirençli olan, meropenem ise duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olan izolatlardan oluşmaktadır. Yalnız karbapenem ve kinolon dirençli olarak adlandırılan üçüncü grup; imipenem dirençli, meropenem orta duyarlı veya dirençli, siprofloksasin orta duyarlı veya dirençli, levofloksasin dirençli olan izolatlardan oluşmaktadır. İzole kinolon dirençli olarak adlandırılan dördüncü grupta ise çalışılan antibiyotikler arasında siprofloksasin ve levofloksasin dirençli izolatlar yer almaktadır.

3.3. KÜLTÜR VE BAKTERİ TANIMLAMASI

Belirtilen tarihler arasında laboratuvara rutin olarak gönderilen tüm klinik örneklerin Kanlı agar (Oxoid, İngiltere), Çikolata agar (Oxoid, İngiltere) ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, gram negatif, basil morfolojisinde ve oksidaz pozitif olan bakterilerin tanımlamaları, biyokimyasal özelliklerine (sitrat kullanımı, glikoz, laktoz, sükröz fermentasyonu, indol/üre hidrolizi, hareket, lizin dekarboksilaz aktiviteleri) göre yapıldı.¹ Bakterilerin ileri tanımlanması için ayrıca otomatize Vitek 2 sisteminin Vitek 2 GN (kolorimetrik) (bioMerieux, Fransa) identifikasyon kartı kullanıldı.

3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

3.4.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Elde edilen tüm izolatların konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve *P. aeruginosa* için Tablo 3'te önerilen zon çaplarına göre yorumlandı. Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.¹¹⁹

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, siprofloksasin (CIP, 5µg), levofloksasin (LEV, 5µg), piperasilin (PIP, 100µg) , piperasilin/tazobaktam (TZP, 100/10 µg), sefepim (FEP, 30µg), imipenem (IPM, 10µg), meropenem (MEM, 10µg), gentamisin (CN, 10µg), amikasin (AK, 30µg), tobramisin (TOB, 10µg), seftazidim (CAZ, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg) antibiyotik diskleri (Becton Dickinson, ABD) kullanıldı.

Tablo 3. *P. aeruginosa* için Zon apları Yorumlama Standartları

Antibiyotik	Zon apı sınır değerleri (mm)		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
PIP (100 µg)	≥18	-	≤17
TZP (100/10 µg)	≥18	-	≤17
CAZ (30µg)	≥18	15-17	≤14
FEP (30µg)	≥18	15-17	≤14
ATM (30µg)	≥22	16-21	≤15
IPM (10µg)	≥16	14-15	≤13
MEM (10µg)	≥16	14-15	≤13
AN (30µg)	≥17	15-16	≤14
CN (10µg)	≥15	13-14	≤12
TOB (10µg)	≥15	13-14	≤12
CIP (5µg)	≥21	16-20	≤15
LEV (5µg)	≥17	14-16	≤13

Kaynak: CLSI. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

3.4.2. İndüklenebilir Beta-Laktamaz (İBL) Tanı Yöntemi

Çalışmaya dahil edilen izolatlardaki İBL üretimi disk yaklaşırma yöntemiyle tespit edildi. Bu yöntemde; sefoksitin ya da imipenem gibi güçlü beta-laktamaz indükleyicilerinin çevresine merkezden merkeze 1.5-2.0 cm uzaklıkta olacak şekilde aztreonam veya 3. kuşak sefalosporin gibi zayıf indükleyici disk yerleştirildiğinde, zayıf indükleyici disklerdeki inhibisyon zonunun en az 4 mm'lik küçülmesi İBL varlığını göstermektedir.¹²⁰

3.4.3. MİK'lerin Belirlenmesi

Elde edilen 50 izolatın seftazidim, gentamisin, piperasilin, siprofloksasin, imipenem ve meropenem için MİK'leri otomatize Vitek 2 sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılarak belirlendi. 37 °C'de 18 saatlik inkübasyonun ardından 3-5 koloni %0,45'lik NaCl içine aktarıldı. Serum fizyolojik içinde hazırlanan bakteri suspansiyonu, Densi-Check 2 sistemi (bioMerieux, Durham, NC) kullanılarak 0,5 McFarland standardındaki bulanıklıkta ayarlandı. Solusyon Vitek 2 sistemine

kartıyla birlikte yüklendi. Gram negatif antimikrobiyal duyarlılık test kartı AST-N174 kullanıldı.

Tablo 4. MİK'lerin yorumlama standartları

Antibiyotik	MİK Yorumlama Standardı (µg/ml)		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
CAZ	≤8	16	≥32
PIP	≤64	–	≥128
CN	≤4	8	≥16
IMP	≤4	8	≥16
MEM	≤4	8	≥16
CIP	≤1	2	≥4

Kaynak: CLSI. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

3.5. qPCR

qPCR; nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç veren bir yöntemdir. Çoğaltmakta olduğumuz DNA'yı floresan boyalar sayesinde bilgisayar ortamından takip edebildiğimiz bu sistemde, çift sarmallı DNA'ya bağlanan Syber Green boyasının floresanın ışınmasıyla birlikte çoğaltmakta olan DNA'nın miktarı tespit edilmektedir.

3.5.1. RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu, Kanlı agar (Oxoid, İngiltere) besiyerine ekimleri yapılan ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen örneklerden High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hazırlanan 0,5 ml'lik hücre (10^8) suspansiyonu 2000g'de 5 dk santrifüj edildi. Örneklerin üzerine 4µl lizozim eklendi ve 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Örneklerin üzerine 400µl Lysis/Binding Buffer (4,5 M guanidine-HCL, 50mM TrisHCL, %30 Triton X-100) eklendikten sonra filtreli tüpe aktarıldı. 15 sn 8000 g'de santrifüj edildi. Sonra örneklerin üzerine 90 µl DNase Incubation Buffer ve 10 µl DNase I eklendi ve 60 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra yıkama

solüsyonlarıyla yıkanan örneklerin üzerine Elution Buffer eklendi ve 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi. Böylece RNA izolasyonu elde edildi.

Bu yöntemde kısaca; asit guanidin ile hücre duvarı eritilip DNaz enzimlerinin etkisizleştirilmesinden sonra asit-fenol ve kloroform ile hücre artıklarının ve kromozomal DNA'nın çöktürülmesi sağlanmaktadır. Daha sonra izopropanol ve tuz yoğunluğu sayesinde çözünürlüğü azalan RNA santrifüj ile çöktürülmekte, %70 yüksek saflıkta alkol ile çökelti yıkanmakta, oda derecesinde kurutulmakta ve 50 µl RNaz-DNaz içermeyen yüksek saflıkta H₂O ile çözülmemektedir. RNA içeriğinde yapısal RNA, tRNA ve mRNA bulunmaktadır ve bu mRNA çok dayanıksızdır, hemen cDNA'ya dönüştürülmesi önerilmektedir.¹²¹

3.5.2. cDNA Sentezi:

cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılarak yapıldı. Soğutucu blok üzerindeki total RNA numunelerine Random Hexamer Primer eklendi ve 65°C'de 10 dk inkube edildi. Soğutucu blok üzerine dizilen tüplere 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase, 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl dNTP karışımından eklendi ve 25°C'de 10 dk, 55°C'de 60 dk, 85°C'de 5 dk inkube edildi. Elde edilen cDNA örnekleri soğutucu blok üzerine dizildi. Hemen çalışılmayacak örnek -20°C'de muhafaza edildi.

3.5.3. cDNA Çoğaltılması (Amplifikasyon)

qPCR çalışmaları için LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanıldı. PCR deneyleri +4°C'deki soğutucu bloklar üzerinde LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche, Almanya) kullanılarak kapiller cam tüplerde çalışıldı. PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) elde edildi. Primerlerin dizileri Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri

Gen	Primer	Dizi(5'-3')	Bant Büyüklüğü
<i>oprD</i>	oprD-F	CGACCTGCTGCTCCGCAACTA	301
	oprD-R	TTGCATCTCGCCCCAGAAGAC	
<i>ampC</i>	ampC-F	CTGTTCGAGATCGGCTC	166
	ampC-R	CGGTATAGGTGCGCTC	
<i>mexB</i>	mexB-F	CAAGGGCGTTCGGTGAAGTCCAG	273
	mexB-R	ACCTGGGAACCGTCGCCTAACT	
<i>mexD</i>	mexD-F	GGAGTTCGGCCAGGTAGTGCTG	236
	mexD-R	ACTGCATGTCCTCGGGCTTCTT	
<i>mexF</i>	mexF-F	CGCCTGGTCACCGAGGAAGAGT	342
	mexF-R	CACCACCAGCACCAGGCGAAGC	
<i>mexY</i>	mexY-F	GGACCGCGCCATCAGCGAACG	288
	mexY-R	ATCGCCCGCTGCATGGCCGC	
<i>rpsL</i>	rpsL-F	GCTGCAAAACTGCCCGCAACG	250
	rpsL-R	ACCCGAGGTGTCCACGCTTGG	

Kontrol cDNA'sı *P. aeruginosa* PAO1'den elde edildi. RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra bütün örneklerde son konsantrasyon 100 ng/μl olarak çalışıldı. Her izolat için üç farklı cDNA örneğinden üç kez amplifikasyon yapıldı ve elde edilen üç ayrı ekspresyon değerinin ortalaması alındı.

PCR reaksiyonu için 25mM MgCl₂, primer (100 pmol/μl), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (FastStart Taq DNA Polimeraz, reaksiyon buffer, SYBR Green I boya, dNTP karışımı) ve steril distile su içeren karışım hazırlandı ve üzerine 2 μl cDNA konularak son reaksiyon hacmi 20 μl olacak şekilde tamamlandı ve kapiller tüplerin içinde karıştırıldı.

Amplifikasyon koşulları:

ampC geni için; 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 45 döngü olarak 95 °C/20 sn denatürasyon, 52°C/10 sn bağlanma ve 72°C/15 sn uzama olarak uygulandı ve sonrasında 95 °C/0 sn denatürasyon, 65°C/15sn bağlanma ve 95 °C/0 sn erime şeklinde erime ısısı analizi yapıldı.

mexY geni için; 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 45 döngü olarak 95 °C/20 sn denatürasyon, 68°C/10 sn bağlanma ve 72°C/15 sn uzama

olarak uygulandı ve sonrasında 95 °C/0 sn denatürasyon, 65°C/15sn bağlanma ve 95 °C/0 sn erime şeklinde erime ısısı analizi yapıldı.

mexB, *mexD*, *mexF* ve *rpsL* genleri için; 95°C’de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 45 döngü olarak 95 °C/15 sn denatürasyon, 60°C/10 sn bağlanma ve 72°C/15 sn uzama olarak uygulandı ve sonrasında 95 °C/0 sn denatürasyon, 65°C/15sn bağlanma ve 95 °C/0 sn erime şeklinde erime ısısı analizi yapıldı.

“FastStart Taq DNA Polimeraz” ısıya dayanıklı rekombinant Taq DNA polimerazın 75°C’ye kadar aktivite göstermeyen kimyasal olarak modifiye edilmiş formudur. Siklus başlamadan önce 95°C’de 10 dk inkübasyonun ardından enzim tam olarak aktive olmaktadır.

Oluşan PCR ürünleri SYBR Green I floresans sinyalinin ölçülmesiyle tespit edilmektedir. SYBR Green I çift sarmallı DNA’ya bağlanır. Bağlı olmayan SYBR Green I boyası çok düşük floresans verse de DNA bağlanmalarında verdiği floresans (dalga boyu, 530 nm) çok yüksektir. Bu nedenle PCR süresince SYBR Green I floresansındaki artış, meydana gelen çift zincirli DNA miktarıyla doğru orantılıdır. LightCycler cihazında qPCR süresince SYBR Green I ile DNA tespitinin ana basamakları:

I- Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon karışımı denature DNA, primer ve SYBR Green I boyası içerir. Bağlı olmayan SYBR Green I boyası, zayıf floresans verir ve bu sinyal bilgisayar analizinde çıkarılır.

II- Primerin bağlanmasından sonra az miktarda SYBR Green I boyası çift zincire bağlanabilir. DNA bağlanmasıyla SYBR Green I boya moleküllerinde yüksek miktarda ışımaya meydana gelir.

III- Çok fazla miktardaki SYBR Green I boya molekülü yeni sentezlenen DNA’ya uzama esnasında bağlanır. Eğer reaksiyon devamlı monitorize edilirse, floresanstaki artış eş zamanlı olarak gözlenir. Diğer ısıtma siklusuyla SYBR Green I boya molekülleri serbest kalır ve floresans sinyali biter.

IV- Her PCR siklusunun uzama basamağının sonunda floresans ölçümü yapılır ve amplifiye DNA’nın artan miktarı monitorize edilir.¹²²

Sadece istenen PCR ürünlerinin çoğaltıldığını göstermek amacıyla qPCR sonrası erime eğrisi analizi yapıldı. Tüm örneklerde aynı erime derecesinde pik oluştuğu görüldü (Şekil 4). Bu yöntemde; reaksiyon karışımının yavaşça 95 °C'ye ısıtılarak, çift zincirli DNA'nın erimesi ve SYBR Green I floresansında azalma sağlanır. Cihaz bu floresanstaki azalmaları monitorize etmekte ve erime pik değerleri olarak gösterir. Her erime pik değeri özel bir DNA ürününün karakteristik erime ısını (T_m) göstermektedir. dsDNA'nın erime derecesini belirleyen en önemli faktörler PCR ürününün uzunluğu ve GC içeriğidir. Eğer qPCR'da yalnız bir ampikon meydana geldiyse, erime eğrisi analizi sadece bir erime piki göstermektedir. Eğer primer dimerleri veya diğer non spesifik ürünler varsa başka erime pikleri görülür.

3.5.4. qPCR'daki Gen Ekspresyon Analizi

3.5.4.1. Gerçek Zamanlı Kantifikasyon Yöntemi

Kantifikasyonun çeşiti mRNA gen ekspresyon düzeyinin tespitinde önemli bir faktördür. mRNA transkripsiyonunun kantifikasyonu mutlak (absolute) veya göreceli (relative) kantitatif gerçek zamanlı PCR ile ölçülebilir.^{123,124,125} Mutlak kantifikasyon örneğin içindeki hedef dizinin kopya sayısını tam olarak ölçmemizi sağlayan bir analiz yöntemidir. Göreceli kantifikasyon ise mRNA ekspresyon düzeyindeki göreceli değişiklikleri, kullandığımız hedef dizi miktarını kontrol ile analiz edilen örneğe oranlayarak göstermektedir.^{123,124,126} Daha basit bir ifadeyle göreceli kantifikasyon örnekle kontrol arasındaki katlık değişimleri tespit etmemize imkan sağlamaktadır. Eğer amaç bir hedef dizinin kopya sayısını tam olarak ölçmekse, bilinen kopya sayılarındaki standartları kullanan mutlak kantifikasyon yöntemi uygulanmalıdır.¹²⁷ Bu iki yöntemde sıklıkla kullanılmakla birlikte göreceli kantifikasyon daha kısa kurulum zamanı olduğu için ve standart eğriye gerek duymadığı için mutlak kantifikasyondan daha kolay uygulanmaktadır.^{126,128,129} Ayrıca gen ekspresyonlarını incelerken mRNA'nın mutlak miktarını bilmemize çoğunlukla gerek olmamaktadır.^{125, 130}

3.5.4.2. Göreceli (Relative) Kantifikasyon:

Göreceli veya karşılaştırmalı (comparative) kantifikasyon mRNA ekspresyon düzeylerindeki göreceli değişiklikleri ölçer. Bir genin kararlı haldeki mRNA düzeyi

ile çoklu örneklerin eksprese ettiği mRNA düzeyindeki değişiklikleri tespit eder.¹²⁵ Göreceli kantifikasyonda kopya sayılarının bilindiği standartlara gerek olmadığından standart kalibrasyon eğrisi oluşturmaya da gerek yoktur.^{126,129}

Bu yöntemde internal standart miktarı bilinmediğinden sadece göreceli değişiklikler tespit edilebilir.¹³¹ Bu durum çoğu araştırma projesinde sorun oluşturmaz çünkü gen ekspresyon düzeyindeki fizyolojik değişiklikleri araştırırken mRNA'nın katlık değişimleri yeterlidir ve mRNA'nın mutlak değeri çoğunlukla gerekmemektedir.^{125,129-131}

Ekspresyon düzeyini belirlemek için eşik döngüsü (threshold cycle) (C_t) ve crossing points (C_p) hesaplanır. Bu yöntemler ΔC_p yöntemleri olarak adlandırılır.^{132,133} Fakat göreceli kantifikasyon prosedürü göreceli parametreler eklenerek daha karmaşık bir hale de gelebilir. Bu karmaşık göreceli kantifikasyon yöntemlerine de $\Delta\Delta C_p$ yöntemleri denir.¹³³

3.5.4.3. Amplifikasyon Etkinliği

Amplifikasyon etkinliği (efficiency) (E) tam bir göreceli kantifikasyon için önemli bir faktördür. Optimal bir PCR reaksiyonunda (%100 etkinlik) her ampikon replike olmalıdır ve ürün miktarı her döngü sonrası ikiye katlanmalıdır ve döngü sayısına karşılık kopya numarasını gösteren çizgisel grafik oluşmalıdır.¹²⁸

3.5.4.4. Normalizasyon

Optimal göreceli ekspresyon sonuçları elde edebilmek için uygun normalizasyon stratejileriyle qPCR süresince deney hatalarının kontrolü yapılmalı ve birbiriyle aynı döngü performansı sağlanmalıdır.^{134,135} Özdeş başlama koşullarını sağlamak için göreceli ekspresyon verileri aşağıdaki değişkenlerden en az birine göre dengelenmeli ve normalize edilmelidir:¹³⁶

- ekstrakte RNA'nın total miktarı
- genomik DNA'nın total miktarı
- referans ribozomal RNA (Ör: 18S veya 28S rRNA)
- referans mesajcı RNA (mRNA)

3.5.4.5. Matematiksel Yöntem

İlgili genin referans gen karşındaki göreceli ekspresyonu ‘delta C_p’ (ΔC_p) veya ‘delta delta C_t’ (ΔΔC_t) değerleri temel alınarak hesaplanabilir. Günümüzde göreceli ekspresyon oranını (R) hesaplamak için döngü farklılıklarını karşılaştırmaya dayalı çeşitli matematiksel yöntemler bulunmuştur.¹³⁶

I- Etkinlik (efficiency) (E) düzeltmesi olmadan ‘delta C_t’ (ΔC_t) (Örnek 1-2) veya ‘delta delta C_t’ (ΔΔC_t) (Örnek 3-4) yöntemi. Bu yöntemde her RT-PCR döngüsünde hedef DNA’da optimal ikiye katlanma (doubling) olduğu varsayılmıştır.^{133, 137}

$$R = 2^{[Ct \text{ örnek} - Ct \text{ kontrol}]} \quad (\text{Örnek 1})$$

$$R = 2^{\Delta Ct} \quad (\text{Örnek 2})$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta Ct \text{ kontrol}]} \quad (\text{Örnek 3})$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad (\text{Örnek 4})$$

II- Tek örneğe dayalı etkinlik düzeltmeli hesaplama modelleri (Örnek 5-6)^{123, 138} ; ve çoklu örneğe dayalı etkinlik düzeltmeli hesaplama modelleri (Örnek 7).¹³⁵

$$\text{Oran (R)} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta C_p \text{ hedef (kontrol-örnek)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_p \text{ ref (kontrol-örnek)}}} \quad (\text{Örnek 5})$$

$$\text{Oran (R)} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta C_p \text{ hedef (kontrol ortalaması-örnek ortalaması)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_p \text{ ref (kontrol ortalaması-örnek ortalaması)}}} \quad (\text{Örnek 6})$$

$$\text{Oran (R)} = \frac{(E_{\text{ref}})^{C_p \text{ örnek}}}{(E_{\text{hedef}})^{C_p \text{ örnek}}} \div \frac{(E_{\text{ref}})^{C_p \text{ kalibratör}}}{(E_{\text{hedef}})^{C_p \text{ kalibratör}}} \quad (\text{Örnek 7})$$

III- Çoklu örneğe dayalı ve en az üç referans gen içeren REF index olarak adlandırılan çoklu referansa dayalı etkinlik düzeltmeli hesaplama modelleri (Örnek 8).¹³⁵

$$\text{Oran (R)} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta C_p \text{ hedef (kontrol ortalaması-örnek ortalaması)}}}{(E_{\text{ref indeks}})^{\Delta C_p \text{ ref index (kontrol ortalaması-örnek ortalaması)}}} \quad (\text{Örnek 8})$$

3.6. ARBİTRARILY PRIMED POLİMERİZE ZİNCİR REAKSİYONU (AP-PCR)

Suşlar arasındaki genotipik benzerlik ilişkisini gösterebilmek için AP-PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde PCR amplifikasyonu, hedef DNA'nın baz diziliminin bilinmesine gerek duyulmadan seçilen standart bir primer kullanarak, düşük bağlanma derecesinde gerçekleştirilmektedir.

3.6.1. DNA Eldesi

AP-PCR yönteminde öncelikle DNA eldesi işlemi gerçekleştirildi ve kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre, öncelikle 500 µl steril distile su, ependorf tüplere koyuldu. Daha sonra, Kanlı agar besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinden 5-6 koloni alınarak, 500 µl steril distile su içeren ependorf tüpünün içinde homojenize edildi ve 95 °C'lik ısı bloğunda 20 dakika tutuldu. Bu sürenin sonunda ısı bloğundan çıkarılan ependorf tüpleri, 1800 g'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant kısmı alınarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı. -20°C'de saklandı.

3.6.2. DNA Çoğaltılması (Amplifikasyon)

AP-PCR ile DNA çoğaltılmasında 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' dizilerine sahip M13 primeri kullanıldı. PCR reaksiyonu için; 2X amplifikasyon karışımı (25mM MgCl₂, 2mMol dNTP, 10X Amplifikasyon tamponu, Steril DNaz ve RNaz içermeyen su) hazırlandı. Her reaksiyon için, 25 µl 2X amplifikasyon karışımı, 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5U/µl) (Bioron, İngiltere), 1 µl primer (100 pmol/µl), 5 µl DNA konularak son reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı.^{139,140}

Amplifikasyon koşulları:

2 siklus 94°C’de 5 dakika denatürasyon, 40°C’de 5 dakika bağlanma ve 72°C’de 5 dakika uzamanın ardından 40 siklus olarak 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 40°C’de 1 dakika bağlanma ve 72°C’de 2 dakika uzama olarak uygulandı. Amplifikasyon için Gene Amp PCR System 9700 Termal Cyclus (Applied Biosystems, Singapur) cihazı kullanıldı.

3.6.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi, 1X TBE tamponu içindeki % 2’lik agaroz jelde (Sigma, Almanya) 120 V akımla 60 dakika elektroforez sonrası Gel Doc UV görüntüleme sistemi (BioRad, Italy) ile yapıldı. Amplifikasyon ürünü brom fenol mavisi içinde 3/4 oranında seyreltildi. Belirleyici olarak ise, 100-bç’lik “DNA ladder” (Bioron, Almanya) kullanıldı.

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde kullanılan tampon ve çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

TBE (Tris-borik asit-EDTA) tamponu

Stok solüsyon (10 X, p H 8.0)

5.84 gr EDTA (pH:8) (Amresco, A.B.D)

61.83 gr Borik asit (Riedel de Haen, Almanya)

121.1 gr Tris (Sigma, Almanya)

Distile su ile hacim 1000 ml’ye tamamlanıp, pH’sı 8.0’e ayarlanarak elde edilen bu solüsyon +4°C’de saklandı.¹⁴¹

Etidyum Bromür (5 mg/ml stok)

2 ml distile suya, 10 mg etidyum bromür karıştırılarak, manyetik çalkalayıcı üzerinde birkaç saat süreyle çözünmesi sağlandı. Sonra bu, renkli şişeye kondu ve şişenin etrafı alüminyum kağıt ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı. Her 100 ml agaroz içine, hazırlanan bu çözeltilerden 10 µl eklendi.

Agaroz jel

100 ml 1X TBE tamponu içerisinde, 2 gr agaroz (Sigma, Almanya) iyice eritildi. Jelin sıcaklığı 60°C'ye gelince stok etidyum bromür çözeltisinden 10 µl eklenerek, iyice karıştırıldıktan sonra jel kabına döküldü.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme SPSS 13.0 programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. İncelenen genlerinin ekspresyonlarının analizi için yazılım (LightCycler® Relative Quantification Software) kullanılarak göreceli (relative) kantitatif değerleri oluşturuldu. Çalışmamızdaki hesaplamalarda aşağıdaki 'delta-delta C_t' metodu kullanılmıştır:

$$\text{Oran (R)} = \frac{(E_{\text{ref}})^{C_p \text{ örnek}}}{(E_{\text{hedef}})^{C_p \text{ örnek}}} \div \frac{(E_{\text{ref}})^{C_p \text{ kalibratör}}}{(E_{\text{hedef}})^{C_p \text{ kalibratör}}}$$

Genlerin transkripsiyon düzeylerini değerlendirmede standart suş olarak PAO1, referans gen olarak ribozomal protein kodlayan *rpsL* geni kullanıldı. *ampC*, *mexD*, *mexF*, veya *mexY* için PAO1 ile karşılaştırıldığında izolatların mRNA düzeyinde 10 katlık artış bu genlerdeki aşırı ekspresyon olarak kabul edildi. İzolatların mRNA düzeyinde 5 katın altındaki artış ise aşırı ekspresyon olmadığı şeklinde yorumlandı. 5-10 kat arası artışta ise sınırda ekspresyon olarak kabul edildi. *mexB* için ise PAO1 ile karşılaştırıldığında izolatların mRNA düzeyindeki 3 katlık artış bu gendeki aşırı ekspresyon olarak kabul edildi. İzolatların mRNA düzeyindeki 2 katın altındaki artış ise aşırı ekspresyon olmadığı şeklinde yorumlandı. 2-3 kat arası artışta ise sınırda ekspresyon olarak kabul edildi. *oprD* ekspresyonunda ise $\geq 70\%$ azalma olduğunda down regülasyon olarak kabul edildi.^{7, 142}

4. BULGULAR

4.1. İZOLAT ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya 50 *P. aeruginosa* klinik izolatu dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen izolatların hepsinin İBL ürettiği tespit edildi. İzolatların elde edildikleri klinik örneklere göre dağılımlarına bakıldığında % 42'sinin trakeal aspirat olduğu gözlemlendi. (Tablo 6)

Tablo 6. *P. aeruginosa* izolatının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	%
Trakeal aspirat	21	42
Bronkoalveoler lavaj	3	6
Balgam	2	4
Kan	4	8
Plevra	4	8
Periton	2	4
Yara	7	14
Doku	6	12
İdrar	1	2

İzolatların elde edildikleri hastaların başvurdukları kliniklerin dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir. İzolatların %66'sı (n=33) yoğun bakım ünitelerinden elde edilmiştir.

Tablo 7. *P.aeruginosa* suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

Klinik	Sayı	%	
Yoğun bakım üniteleri	Reanimasyon	7	14
	Göğüs hastalıkları	11	22
	Acil	2	4
	Nöroşirürji	2	4
	Genel cerrahi	4	8
	İç hastalıkları	2	4
	Nöroloji	4	8
	Plastik cerrahi	1	2
Cerrahi klinikler	Plastik cerrahi	6	12
	Genel cerrahi	1	2
	Üroloji	1	2
	Kalp damar cerrahisi	1	2
Dahili klinikler	İç hastalıkları	2	4
	Göğüs hastalıkları	3	6
	Dermatoloji	1	2
	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2	4
Toplam	50	100	

4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

4.2.1. Konvansiyonel Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan 50 izolatın disk diffüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir. İzolatların tümünde indüklenebilir beta laktamaz tespit edilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda yapılan antibiyotik duyarlılık test profillerine göre tüm izolatlar dört gruba ayrılarak incelenmiştir. Birinci grup, çoklu ilaç dirençli olarak kabul edilen 22 izolattan, ikinci grup izole karbapenem dirençli dokuz izolattan, üçüncü grup yalnız karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolattan, dördüncü grup ise izole kinolon dirençli 12 izolattan oluşmaktadır.

Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli izolatların tümü seftazidime, piperasiline, imipeneme ve gentamisine dirençli bulunmuştur. Bu grupta sadece piperasilin-tazobaktam (%59) ve amikasin (%46) duyarlı bulunmuştur. İkinci gruptaki izole

karbapenem dirençli izolatların tümü imipenem dirençli olup üç izolat (%33) meropenem dirençli bulunmuştur. Üçüncü gruptaki izolatların tümü imipenem ve levofloksasin dirençli olup dört izolat (%57) meropenem ve siprofloksasin dirençli bulunmuştur. Dördüncü grupta ise izolatların tümü siprofloksasin ve levofloksasin dirençli, çalışılan diğer antibiyotikler ise duyarlı bulunmuştur.

Tablo 8. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları

	İzolat Sayısı(%) [n=50]			Grup 1(%) [n=22]			Grup 2(%) [n=9]			Grup 3(%) [n=7]			Grup 4(%) [n=12]		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
IPM (10µg)	12(24)	0	38(76)	0	0	22(100)	0	0	9(100)	0	0	7(100)	12(100)	0	0
MEM (10µg)	15(30)	6(12)	29(58)	0	0	22(100)	3(33)	3(33)	3(33)	0	3(43)	4(57)	12(100)	0	0
CAZ (30 µg)	28(56)	0	22(44)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
FEP (30µg)	28(56)	8(16)	14(28)	0	8(36)	14(64)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
PIP (100µg)	29(58)	0	21(42)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
TZP (100/10 µg)	41(82)	0	9(18)	13(59)	0	9(41)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
ATM (30 µg)	27(54)	1(2)	22(44)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
CIP (5µg)	9(18)	3(6)	38(76)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	0	3(43)	4(57)	0	0	12(100)
LEV (5µg)	9(18)	0	41(82)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	0	0	7(100)	0	0	12(100)
AK (30µg)	38(76)	4(8)	8(16)	10(46)	4(18)	8(36)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
CN (10µg)	28(56)	0	22(44)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0
TOB (10µg)	28(56)	0	22(44)	0	0	22(100)	9(100)	0	0	7(100)	0	0	12(100)	0	0

S:Duyarlı I:Orta duyarlı R:Dirençli

Grup 1: Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarıGrup 2: İzole karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarıGrup 3: İzole karbapenem ve kinolon dirençli *P. aeruginosa* izolatlarıGrup 4: İzole kinolon dirençli *P. aeruginosa* izolatları

4.2.2. Otomatize Sistemle Belirlenen MİK Düzeyleri

Disk difüzyon test sonuçlarına göre antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenen izolatların seftazidim, gentamisin, piperasilin, siprofloksasin, imipenem ve meropenem için MİK sonuçları Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Minimal İnhibitor Konsantrasyonlar (MİK)
MİK (mg/L) Değerleri

İzolat	Grup	CAZ	PIP	CN	IPM	MEM	CIP
1	1	≥64	≥128	≥16	≥16	8	≥4
2	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
3	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
4	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
5	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
6	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
7	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
8	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
9	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
10	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
11	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
12	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
13	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
14	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
15	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
16	1	≥64	≥128	≥16	≥16	8	≥4
17	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
18	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
19	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
20	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
21	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
22	1	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4
23	2	2	8	≤1	≥16	4	≤0,25
24	2	2	8	≤1	≥16	8	≤0,25
25	2	4	32	≤1	≥16	≥16	≤0,25
26	2	4	8	≤1	≥16	4	≤0,25
27	2	4	16	≤1	≥16	≥16	≤0,25
28	2	2	8	≤1	≥16	4	≤0,25
29	2	2	≤4	≤1	≥16	≤0,25	≤0,25
30	2	4	≤4	≤1	≥16	4	≤0,25
31	2	4	64	2	≥16	≥16	≤0,25
32	3	8	64	4	≥16	≥16	≥4
33	3	4	32	≤1	≥16	≥16	≥4
34	3	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4
35	3	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4
36	3	8	32	≤1	≥16	≥16	≥4
37	3	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4
38	3	4	16	2	≥16	≥16	≥4
39	4	4	16	4	≤1	0,5	≥4
40	4	4	16	≤1	2	4	≥4
41	4	8	64	4	2	4	≥4
42	4	4	16	4	2	1	2
43	4	4	32	≤1	2	4	≥4
44	4	4	16	≤1	2	2	≥4
45	4	4	32	≤1	≤1	4	≥4
46	4	4	8	≤1	≤1	4	≥4
47	4	4	16	≤1	2	4	≥4
48	4	4	32	2	2	4	≥4
49	4	4	32	4	≤1	2	≥4
50	4	4	32	4	≤1	1	≥4
PAO1	1	2	8	≤1	2	1	≤0,25

4.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

4.3.1. qPCR Sonuçları

oprD, *ampC*, *mexB*, *mexD*, *mexF* ve *mexY* gen bölgelerinin qPCR yöntemiyle belirlenen göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Göreceli Gen Ekspresyonu

İzolat	Grup	Göreceli Gen Ekspresyonu (PAO1'in Katları)					
		<i>oprD</i>	<i>ampC</i>	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>
1	1	0,165	1.308	9	1.003	182	4.416
2	1	0,285	1.785	21	19.410	175	7.785
3	1	0	12.718	133	90.833	2.143	36.636
4	1	0	15.245	290	24.294	3.554	32.232
5	1	0,005	9.354	50	8.384	227	5.595
6	1	0	3.902	222	26.038	1.011	385
7	1	1,524	1.235	31	25.064	157	262
8	1	0	342	22	11.658	543	7.202
9	1	0	806	0,293	44	2,5	347
10	1	0,3	422	10	2.125	0	368
11	1	0	1.986	148	1.282	2.548	312
12	1	0	9.179	14	1.401	74	4.852
13	1	0,0001	4	0,23	0,7	0,004	0,52
14	1	1,01	3.244	43	30.205	13712	2.873
15	1	0	2.017	14	72	34	4.882
16	1	0,002	4.740	20	2.650	372	396
17	1	0	1.892	69	10.894	93	3.379
18	1	0,011	126	2,4	100	11	241
19	1	0,168	143	2,6	270	0	21
20	1	0,001	10	0,6	22	0	1,6
21	1	0,003	2.142	0,36	4	0	204
22	1	0,014	5.475	2,4	76	0,017	0
23	2	0,029	41	17	1,7	0	0
24	2	0,034	1,59	0,61	3,5	0,31	0
25	2	0,04	14	3,44	217	0	0
26	2	0,509	4	14	21	0	0
27	2	0,28	0	4,4	4	0	0
28	2	2	0,004	1,3	11	0,02091	0
29	2	0,736	0,13	2,2	8,6	0	0,076
30	2	14,256	0,206	1,9	41	0	0,044
31	2	0,875	1,72	3,07	80	0,17424	0,22
32	3	0,29	4	13,7	466	0,05742	0,48
33	3	7,06	0,81	6,5	151	4	0,16
34	3	0,824	0,71	4,4	47	2,5	0,08
35	3	4,487	1,02	11	261	4	0,55
36	3	1,555	0,28	4,1	40	3	0,05
37	3	5,699	1,84	7,1	652	17	1,97
38	3	2,888	0,22	2,2	129	6,9	0,58
39	4	1,421	0,82	3,5	47	8,4	3,49
40	4	2,183	1,06	10	201	81	4,14
41	4	0,0006	0,18	4,2	47	6,7	0,5
42	4	0,00007	0,69	11	324	30	3,03
43	4	0,3	0,7	5	150	56	11,4
44	4	1,918	0,28	3,2	48	5	0,64
45	4	1,499	0,41	6,1	85	20	3,28
46	4	0,888	0,39	5,4	97	11	3,58
47	4	4,632	0,64	4,1	57	10	6,54
48	4	4,626	0,92	3,7	79	14	3
49	4	0,714	0,34	4	74	8,9	2,17
50	4	0,518	0,1	3,1	44	2,8	1,64

4.3.1.1. *oprD* Gen Ekspresyonu

oprD miktarı; 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 26'sında düşük bulundu. Fakat bunlar arasında 19 izolat referans suş PAO1 ile karşılaştırıldığında %70 ve üzeri azalma gösterdiğinden anlamlı kabul edildi. Dokuz izolatta *oprD* miktarı tespit edilemedi. Onbeş izolatta ise *oprD* miktarı referans suş ile karşılaştırıldığında yüksek bulundu. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 11 izolatta *oprD* miktarındaki azalma anlamlı tespit edildi. Dokuz izolatta ise *oprD* miktarı tespit edilemedi. Geri kalan iki izolattan birinde *oprD* miktarı değişmeden kalırken diğerindeki *oprD* miktarı yüksek (1,5 kat) bulundu. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattaki *oprD* miktarı yedi izolatta azaldı ve bunların dördünde anlamlı bulundu. İki izolatta ise artış saptandı. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolattaki *oprD* miktarı iki izolatta azaldı ve bunların biri anlamlı bulundu. Diğer beş izolatta ise *oprD* miktarında artış görüldü. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolattaki *oprD* miktarı altı izolatta azaldı ve bunların üçü anlamlı bulundu. Bu gruptaki diğer altı izolatta ise *oprD* miktarı yüksek bulundu.

4.3.1.2. *ampC* Gen Ekspresyonu

ampC aşırı ekspresyonu; 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 23'ünde belirlendi. Bu izolatlarda referans suş PAO1 ile karşılaştırıldığında 10 kat artış anlamlı kabul edildi. Bir izolatta *ampC* miktarı tespit edilemedi. Referans suş ile karşılaştırıldığında 26 izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 21'inde *ampC* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolattaki artış ise anlamlı kabul edilmedi. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan ikisinde *ampC* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta da *ampC* miktarı tespit edilemedi. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolatta aşırı ekspresyon görülmedi. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli oniki izolatta aşırı ekspresyon görülmedi.

4.3.1.3. Atım Pompa Genlerinin Ekspresyonları

4.3.1.3.1. *mexB* Gen Ekspresyonu

mexB aşırı ekspresyonu, 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 38'inde belirlendi. Bu izolatlar referans suş PAO1 ile karşılaştırıldığında 3 katlık artış anlamlı kabul edildi. Beş izolatta ise sınırdaki ekspresyon (referans suşla karşılaştırıldığında 2-3 kat arası artış) belirlendi. Yedi izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi (referans suşla karşılaştırıldığında 2 katın altındaki artış). Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 15'inde *mexB* aşırı ekspresyonu belirlendi. Üç izolatta ise sınırdaki ekspresyon belirlendi. Dört izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan beşinde *mexB* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta sınırdaki ekspresyon belirlendi. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolatın altısında *mexB* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta ise sınırdaki ekspresyon belirlendi. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolatın tümünde *mexB* aşırı ekspresyonu belirlendi.

4.3.1.3.2. *mexD* Gen Ekspresyonu

mexD aşırı ekspresyonu 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 44'ünde belirlendi. Altı izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 20'sinde *mexD* aşırı ekspresyonu belirlendi. İki izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan beşinde *mexD* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta ise sınırdaki ekspresyon belirlendi. Üç izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolatın hepsinde *mexD* aşırı ekspresyonu belirlendi. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolatın hepsinde *mexD* aşırı ekspresyonu belirlendi.

4.3.1.3.3. *mexF* Gen Ekspresyonu

mexF aşırı ekspresyonu 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 23'ünde belirlendi. Beş izolatta ise sınırdaki ekspresyon belirlendi. On iki izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. On izolatta ise *mexF* miktarı tespit edilemedi. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 15'inde *mexF* aşırı ekspresyonu belirlendi. Dört izolatta ise *mexF* miktarı tespit edilemedi. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan altısında *mexF* miktarı tespit edilemedi. Üçüncü gruptaki karbapenem ve

kinolon dirençli yedi izolatin birinde *mexF* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta ise sınırda ekspresyon belirlendi. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolatin yedisinde *mexF* aşırı ekspresyonu belirlendi. Dört izolatta ise sınırda ekspresyon belirlendi.

4.3.1.3.4. *mexY* Gen Ekspresyonu

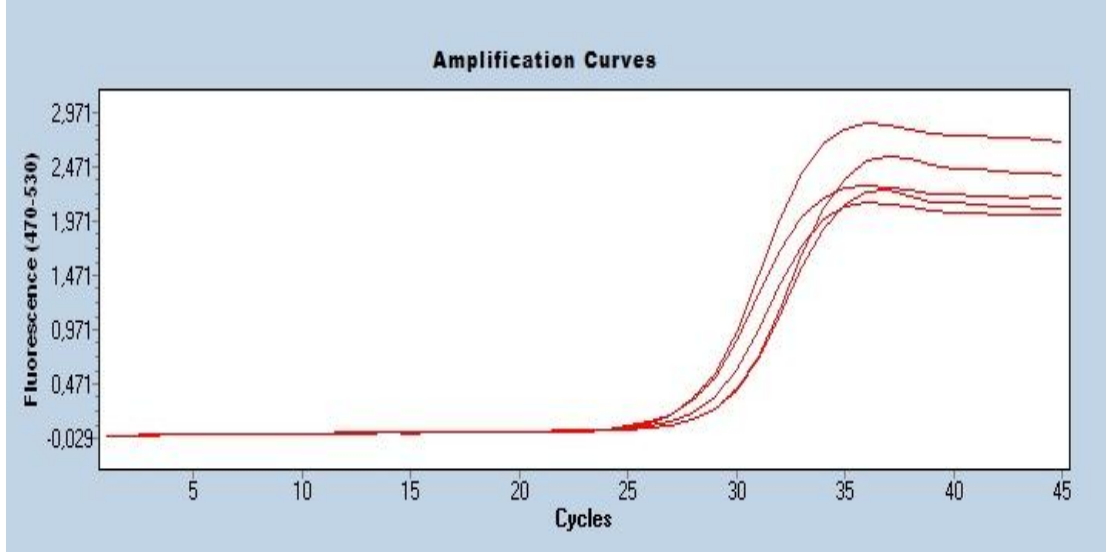
mexY aşırı ekspresyonu 50 klinik *P. aeruginosa* izolatinın 20'sinde belirlendi. Bir izolatta ise sınırda ekspresyon belirlendi. Yirmi iki izolatta ise aşırı ekspresyon görülmedi. Yedi izolatta ise *mexY* miktarı tespit edilememiştir. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 22 izolattan 19'unda *mexY* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta ise *mexY* miktarı tespit edilememiştir. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan altısında *mexY* miktarı tespit edilememiştir. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolatin hiçbirinde aşırı ekspresyon görülmedi. Dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolatin birinde *mexY* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bir izolatta ise sınırda ekspresyon belirlendi.

Çalışmamızda dört farklı gruba ayrılarak incelenen izolatların *oprD* down regulasyonu, *ampC* geni ve atım pompa genlerinin aşırı ekspresyonları Tablo 11'de gösterilmiştir. 50 izolat arasında incelenen genlerin görülme sıklığı sırasıyla *mexD* (%88), *mexB* (%76), *mexF* (%46), *ampC* (%46), *mexY* (%40), *oprD* (%38) olarak belirlenmiştir.

Tablo 11. Çeşitli Direnç Fenotiplerindeki İzolatlarda Direnç Genlerinin Aşırı Ekspresyonu ve Down regulasyonu

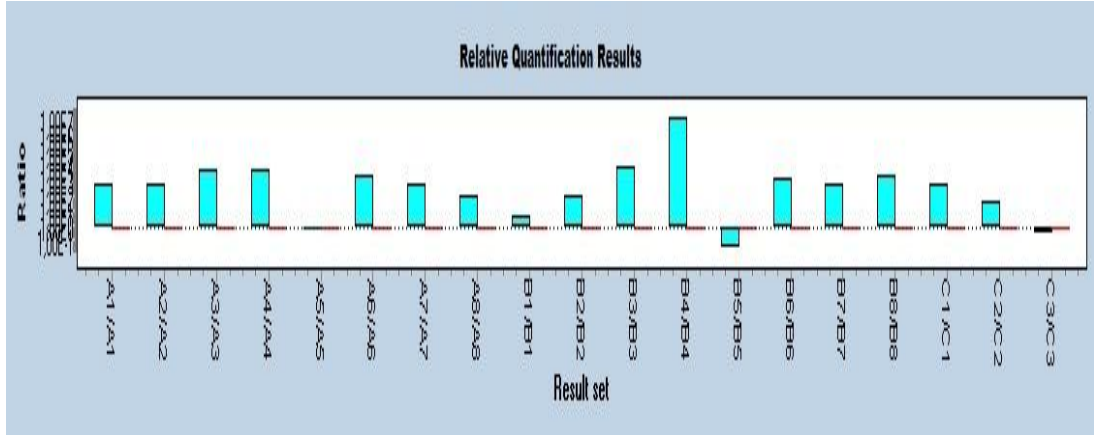
İzolat Sayısı(%)	MİK(µg/ml)							<i>oprD</i> Down-regulasyon ve Atım Aşırı Ekspresyon Sayısı(%)					
	CAZ	PIP	CN	IPM	MEM	CIP	L VX	<i>oprD</i>	<i>ampC</i>	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>
50(%100)	S/T/R	S/T/R	S/T/R	S/T/R	S/T/R	S/T/R	S/T/R	19(38)	23(46)	38(76)	44(88)	23(46)	20(40)
22(%44)	R	R	R	R	R	R	R	11(50)	21(95,4)	15(68,1)	20(90,9)	15(68,1)	19(86,3)
9(%18)	S	S	S	R	S/T/R	S	S	4(44,4)	2(22,2)	5(55,5)	5(55,5)	0	0
7(%14)	S	S	S	R	L/R	L/R	R	1(14,2)	0	6(85,7)	7(100)	1(14,2)	0
12(%24)	S	S	S	S	S	R	R	3(25)	0	12(100)	12(100)	7(58,3)	1(8,3)

Şekil 2'de SYBR Green I boya molekülünün yeni sentezlenen DNA'ya bağlanmasıyla oluşan reaksiyonun monitorizasyonunda floresans miktarındaki artış eş zamanlı olarak gözlenmektedir.



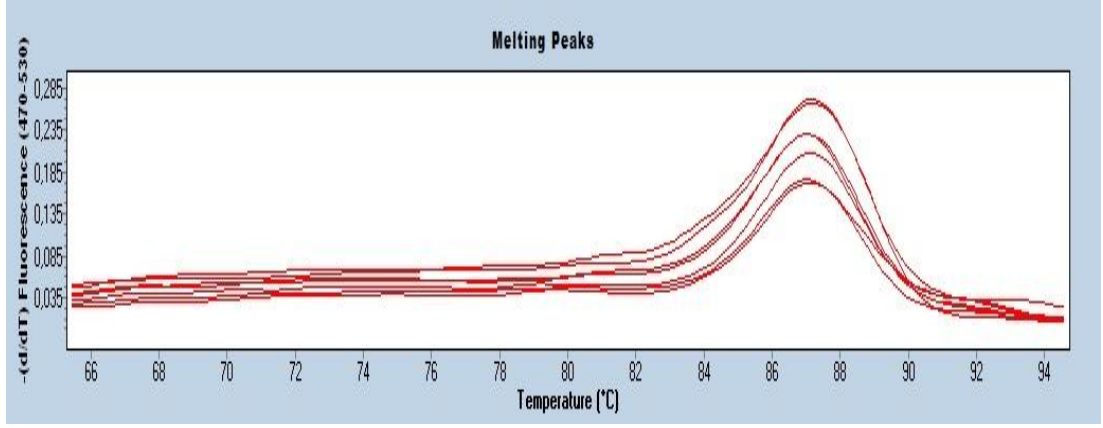
Şekil 2. Döngüye karşılık gelen Floresans Değerlerinin Ölçümüyle Elde edilen Amplifikasyon Eğrileri

LightCycler cihazında real-time PCR süresince nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle elde edilen kantitatif sonuçlar Şekil 3'te gösterilmiştir. Yazılım kullanılarak hesaplanan kantitatif değerler incelenen genlerin ekspresyonlarının analizinde kullanılmıştır.



Şekil 3: İncelenen genlerin ekspresyonlarının 'delta-delta C_t ' metoduyla hesaplanan kantitatif değerlerinin analizi

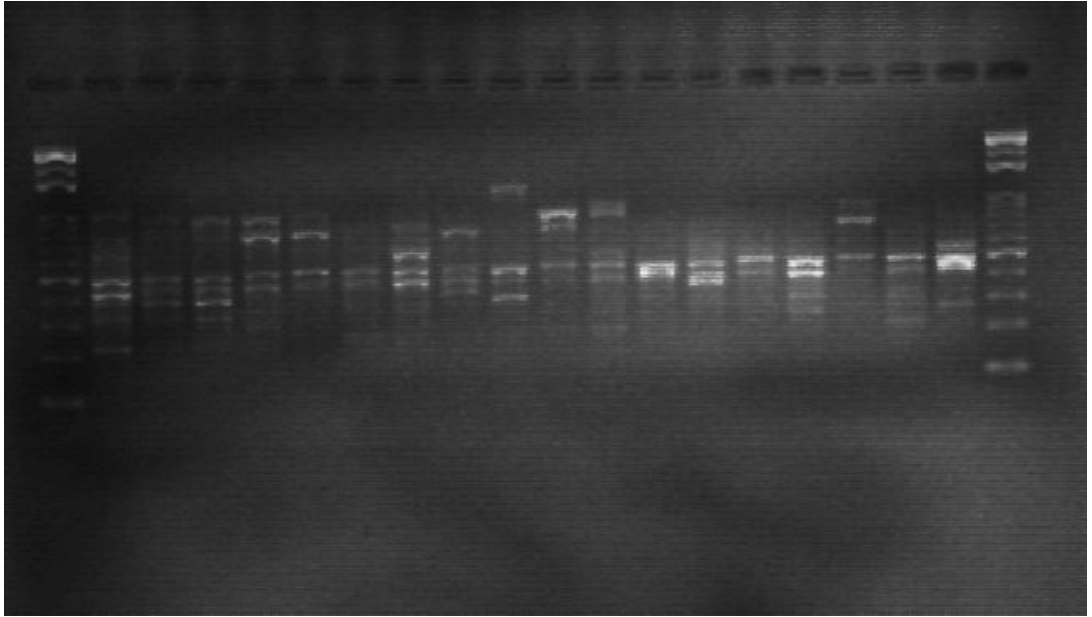
PCR sonrası yapılan Erime Eğrisi analizinde sadece hedeflenen PCR ürünlerinin çoğaltıldığı gösterildi. Tüm örneklerde aynı erime derecesinde pik oluştuğu görüldü (Şekil 4). Erime eğrisi analizi sadece bir erime piki görüldüğünden PCR'da yalnız bir ampikon meydana geldiği ve diğer non spesifik ürünler olmadığı kabul edildi.



Şekil 4. qPCR sonrası Erime Eğrisi analiziyle PCR ürünlerinin tanımlanması

4.3.2. AP-PCR Sonuçları

50 klinik izolat arasındaki benzerliği gösterebilmek için kullandığımız AP-PCR yönteminde amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Suşlar arasındaki benzerlikler, oluşan bant profilleri karşılaştırılarak değerlendirildi ve 18 farklı patern tespit edildi. Farklı paternleri gösteren amplifikasyon ürünleri Resim 1’de gösterilmiştir.



Resim 1: AP-PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

AP-PCR çalışması sonrasında 18 farklı paternde gruplandırılan *P.aeruginosa* izolatlarının MİK ve göreceli mRNA ekspresyon düzeyleriyle birlikte verileri Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. *P.aeruginosa* izolatlarının AP-PCR çalışması sonrasında gruplandırılması ve mRNA ekspresyon düzeyleri

İzolat	Grup*	MİK(µg/ml)						Göreceli Gen Ekspresyonu (PAOI'in Katları)					
		CAZ	PIP	CN	IPM	MEM	CIP	<i>oprD</i>	<i>ampC</i>	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>
1	1	≥64	≥128	≥16	≥16	8	≥4	0,165	1.308	9	1.003	182	4.416
2	2	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,285	1.785	21	19.410	175	7.785
3	2	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	12.718	133	90.833	2.143	36.636
4	2	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	15.245	290	24.294	3.554	32.232
5	2	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,005	9.354	50	8.384	227	5.595
20	2	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,001	10	0,6	22	0	1,6
6	3	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	3.902	222	26.038	1.011	385
7	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	1,524	1.235	31	25.064	157	262
8	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	342	22	11.658	543	7.202
9	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	806	0,293	44	2,5	347
10	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,3	422	10	2.125	0	368
11	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	1.986	148	1.282	2.548	312
12	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	9.179	14	1.401	74	4.852
13	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,0001	4	0,23	0,7	0,004	0,52
15	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	2.017	14	72	34	4.882
17	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0	1.892	69	10.894	93	3.379
18	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,011	126	2,4	100	11	241
19	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,168	143	2,6	270	0	21
22	4	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,014	5.475	2,4	76	0,017	0
14	5	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	1,01	3.244	43	30.205	13712	2.873
16	6	≥64	≥128	≥16	≥16	8	≥4	0,002	4.740	20	2.650	372	396
21	6	≥64	≥128	≥16	≥16	≥16	≥4	0,003	2.142	0,36	4	0	204
23	7	2	8	≤1	≥16	4	≤0,25	0,029	41	17	1,7	0	0
24	8	2	8	≤1	≥16	8	≤0,25	0,034	1,59	0,61	3,5	0,31	0
25	9	4	32	≤1	≥16	≥16	≤0,25	0,04	14	3,44	217	0	0
26	10	4	8	≤1	≥16	4	≤0,25	0,509	4	14	21	0	0
27	11	4	16	≤1	≥16	≥16	≤0,25	0,28	0	4,4	4	0	0
28	12	2	8	≤1	≥16	4	≤0,25	2	0,004	1,3	11	0,021	0
29	12	2	≤4	≤1	≥16	≤0,25	≤0,25	0,736	0,13	2,2	8,6	0	0,076
30	12	4	≤4	≤1	≥16	4	≤0,25	14,256	0,206	1,9	41	0	0,044
31	12	4	64	2	≥16	≥16	≤0,25	0,875	1,72	3,07	80	0,174	0,22
33	13	4	32	≤1	≥16	≥16	≥4	7,06	0,81	6,5	151	4	0,16
34	13	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4	0,824	0,71	4,4	47	2,5	0,08
36	13	8	32	≤1	≥16	≥16	≥4	1,555	0,28	4,1	40	3	0,05
32	14	8	64	4	≥16	≥16	≥4	0,29	4	13,7	466	0,057	0,48
35	14	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4	4,487	1,02	11	261	4	0,55
37	14	4	16	≤1	≥16	≥16	≥4	5,699	1,84	7,1	652	17	1,97
38	14	4	16	2	≥16	≥16	≥4	2,888	0,22	2,2	129	6,9	0,58
39	15	4	16	4	≤1	0,5	≥4	1,421	0,82	3,5	47	8,4	3,49
40	15	4	16	≤1	2	4	≥4	2,183	1,06	10	201	81	4,14
41	15	8	64	4	2	4	≥4	0,0006	0,18	4,2	47	6,7	0,5
42	15	4	16	4	2	1	2	0,00007	0,69	11	324	30	3,03
43	15	4	32	≤1	2	4	≥4	0,3	0,7	5	150	56	11,4
45	15	4	32	≤1	≤1	4	≥4	1,499	0,41	6,1	85	20	3,28
46	15	4	8	≤1	≤1	4	≥4	0,888	0,39	5,4	97	11	3,58
47	15	4	16	≤1	2	4	≥4	4,632	0,64	4,1	57	10	6,54
48	15	4	32	2	2	4	≥4	4,626	0,92	3,7	79	14	3
44	16	4	16	≤1	2	2	≥4	1,918	0,28	3,2	48	5	0,64
49	17	4	32	4	≤1	2	≥4	0,714	0,34	4	74	8,9	2,17
50	18	4	32	4	≤1	1	≥4	0,518	0,1	3,1	44	2,8	1,64

* Tüm izolatların AP-PCR sonrası 18 farklı paterndeki gruplandırması

5.TARTIŞMA

P. aeruginosa bitkileri, hayvanları ve insanları kapsayan farklı yaşam formlarından izole edilebilen ve sıkça rastlanan bir mikroorganizmadır. *P. aeruginosa*'nın asgari besin ihtiyacıyla hayatta kalabilmesi ve farklı fiziksel koşullara toleransı bu mikroorganizmanın hem toplumun yaşam alanlarında hem de hastane ortamında hakim olmasına imkan sağlamıştır. *P. aeruginosa*'nın yaşam alanlarında izole edildiği yerler arasında; yüzme havuzları, jakuziler, küvetler, kontakt lens solüsyonları ve ev nemlendiricileri sayılabilir. Hastanelerde izole edilen yerler arasında ise solunumsal tedavi cihazları, antiseptikler, sabunlar, lavabolar, paspaslar, ilaçlar, fizyoterapi aletleri ve hidroterapi havuzları sayılabilir.⁵

İnsanda *P. aeruginosa*'ya mikrobiyal florada pek sık rastlanmamaktadır. İnsanda belli bölgeler için değişen kolonizasyon oranları ciltte %0-2, nazal mukozada %0-3.3, boğazda %0-6.6 ve fekal örneklerde %2.6-24 şeklinde bildirilmiştir.¹⁴³ Fakat özellikle travmaya maruz kalan hastalarda veya kateterler, trakeostomi, mekanik ventilasyon, ameliyat veya ciddi yanık yüzünden kutanöz veya mukozal bariyerlerde bir açıklık meydana gelen hastalardaki kolonizasyon oranları hastanede yatış süreci boyunca %50'yi geçebilir. *P. aeruginosa*'yla kolonizasyon riski immunitesi bozuk hastalarda daha fazladır ve antimikrobiyal tedavi sonrası normal mikrobiyal floradaki bozulmanın *P. aeruginosa* kolonizasyonunu arttırdığı da gösterilmiştir.⁵

P. aeruginosa'nın toplum kaynaklı enfeksiyon potansiyeline rağmen *P. aeruginosa*'yla meydana gelen ciddi enfeksiyonlar genelde hastane kaynaklıdır. CDC Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyonlar Sürveyans Sistemi tarafından 1986-1998 yılları arasındaki verilere göre yapılan bir sürveyans çalışmasında¹⁴⁴ nozokomiyal enfeksiyonlar açısından *P. aeruginosa* pnomoninin 2. (%14-16), üriner sistem

enfeksiyonlarının 3. (%7-11), cerrahi alan enfeksiyonlarının 4. (%8) ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının 7. nedeni (%2-6) olduğu belirtilmiştir.

Dünya genelinde yapılan sürveyans çalışmalarında farklı ülkelerden ve bölgelerden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık oranları zamanla değişmektedir. SENTRY antimikrobiyal sürveyans programının 1997-2007 tarihleri arasındaki çalışmada Avrupa ve Latin Amerika ülkelerinde piperasilin-tazobaktam en etkili antipseudomonal ilaç olarak bulunurken 2003-2008 yılları arasında Çin'de yapılan bir sürveyans çalışmada ise meropenem en etkili antipseudomonal olarak bulunmuştur.^{145,146} Ülkemizde yapılan çok merkezli sürveyans çalışmalarında da benzer olarak piperasilin-tazobaktam en etkili antibiyotik olarak bildirilmesine rağmen bölgesel çalışmalarda elde edilen sonuçlarda amikasin de etkili antibiyotikler arasında gösterilmekte,^{147,148} amikasine direnç oranının % 1-34 arasında olduğu bildirilmektedir.^{149,150} Ülkemizdeki çok merkezli sürveyans çalışmalarına¹⁵¹ benzer olarak çalışmamızdaki izolatlar arasında da en etkili antibiyotiğin piperasilin-tazobaktam (% 82 duyarlı) olduğu gözlenmiştir. Piperasilin-tazobaktama benzer şekilde amikasine de yüksek duyarlılık (%76) saptanmıştır.

Ülkemizdeki çeşitli çalışmalarda *P.aeruginosa* izolatlarındaki siprofloksasin direnci % 9⁽¹⁵²⁾ ila % 46⁽¹⁵³⁾ arasında değişmektedir. Geniş kapsamlı bir sürveyans çalışması olan SENTRY çalışmasının 1997-2007 tarihleri arasındaki verilerine göre siprofloksasin duyarlılığı % 71.5 olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda değerlendirilen izolatlarda gözlenen siprofloksasine ve levofloksasine duyarlılık oranı ise % 18 olarak bulunmuştur.

Kuster ve ark.'nın çalışmasında *P. aeruginosa* izolatlarının yoğun bakım ünitelerindeki antibiyotik duyarlılık oranları hastanenin diğer servisleriyle karşılaştırıldığında genellikle düşük bulunmuştur.¹⁵⁴ Özellikle imipeneme ve meropeneme duyarlılık oranı anlamlı olarak düşüktür. Bizim çalışmamızdaki duyarlılık oranlarının da düşük olmasının bir sebebi, kullanılan örneklerin büyük oranda (% 66) yoğun bakım ünitelerinden izole edilen örnekler olmasıdır. Bunun yanında çalışmamızdaki izolatlarda kombine tedavide kullanılan aminoglikozid grubu ajanlara karşı genellikle duyarlı olmaları literatürle uyumludur.

Antimikrobiyal ajanların duyarlılık oranları aynı hastane içindeki servisler arasında bile değişim gösterebilmektedir. Antimikrobiyal ajanların yanlış kullanımı ya da kullanım politikaları arasındaki farklılık bunun en sık nedeni olmakla birlikte hastanenin yapısı, infeksiyon kontrolü, hastaların özellikleri de direnç profillerini değiştiren sebeplerdir.¹⁵⁵ Bu sebeplerin yanında antimikrobiyal dirençle mücadelede bakteriye ait faktörleri de ayrı tutmamak gerekir. *P. aeruginosa*, bakteriyel dirençte bilinen birçok enzimatik ve mutasyonel mekanizmalara sahiptir ve bu mekanizmalar çoğu kez eş zamanlı olarak bulunmakta ve suşlarda çoklu dirence neden olmaktadır.

156 157

Dış membran proteini OprD'nin karbapenemler için ana giriş kapısı vazifesi gördüğü ve imipenemin, belirli düzeylerde de meropenemin OprD aracılığıyla *P.aeruginosa*'nın içine girdiği düşünülmektedir. Dış membranda OprD kaybı, *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere duyarlılığını anlamlı derecede azaltmaktadır.^{62,158,159} Bu membran proteininin kaybının imipeneme kazanılmış dirençte, daha düşük oranda da meropeneme dirençte büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir.¹⁶⁰ İncelediğimiz 50 klinik *P. aeruginosa* izolatu arasında imipenem dirençli 38 izolatu 20'sinde *oprD* mRNA düzeyleri düşük bulundu ve *oprD*'deki bu azalma 16 izolatta anlamlı bulundu. Dokuz izolatta ise *oprD* tespit edilemedi. İzole karbapenem dirençli (imipenem MİK'i ≥ 16 , meropenem MİK'leri değişken) 9 izolatu 7'sinde görülen *oprD* mRNA düzeylerinde azalma, PAO1 referans suşuyla karşılaştırıldığında 4 izolatta anlamlı bulundu. Çoklu ilaç dirençli 22 izolattaki *oprD* mRNA miktarında görülen azalma ise 11 izolatta anlamlı bulundu. Dokuz izolatta ise *oprD* miktarı tespit edilemedi. Bu izolatların hepsinde imipenem MİK'i ≥ 16 ve meropenem MİK'i 8 ve ≥ 16 gibi yüksek değerlerde bulundu. *oprD* miktarını tespit edemediğimiz izolatlar ise sadece çoklu ilaç dirençli izolatların olduğu birinci grupta görüldü. Bunun sebebi olarak RT-PCR çalışmamızda kullanılan primerlerle çoğaltmayı hedeflediğimiz bölgede mutasyon bulunması veya *oprD*'nin kullanılan sistemle tespit edilemeyecek kadar düşük miktarda eksprese edilmesi düşünüldü. Ayrıca çoklu atım sisteminin de eş zamanlı ekspresyonun görüldüğü bu grupta çoklu mutasyon ihtimali de yüksektir.

Quale ve ark.'nın çalışmasında 33 izolat arasından *oprD* mRNA ekspresyonunu tespit edemedikleri 7 izolatta tüm *oprD* genini amplifiye edip sekans çalışmaları

yapıldı. Primerlerle çoğaltmayı hedefledikleri bölgede bu 7 izolattan 2'sinde mutasyon tespit edildi. Diğer 5 izolatla ilgili çalışmaların başarısız olması ise bu genlerde çoklu mutasyon olduğunu düşündürmektedir.¹⁶¹ *oprD* gen ekspresyonunun araştırıldığı bir başka çalışmada ise 32 izolatın 24'ünde *oprD* geninin inaktive mutasyonlarına rastlandı.¹⁶²

Moleküler mekanizmalarla meydana gelen *oprD* ilişkili dirençte; *oprD* transkripsiyonel ekspresyonunda azalma ve/veya dış membrandaki fonksiyonel bir porinin translasyonel yapımında bozulmaya yol açan mutasyonlar bulunmaktadır. *oprD* transkripsiyon düzeyinde tanımlanan mekanizmalar arasında ise *oprD* promoterin aksaması, *oprD* transkripsiyonunun prematür terminasyonu, eser metallerinin direnç mekanizmalarının ko-regülasyonu, salisilat aracılı azalma ve MexEF-OprN atım pompasıyla birlikte düzenlenen mekanizmalar aracılığıyla transkripsiyonel ekspresyondaki azalma gösterilmektedir.⁴⁰

oprD promoter aksamaları *oprD* akış yukarı kısmındaki insersiyon veya delesyonlar sonucunda meydana gelir. Yoneyama ve Nakae, promoter ve başlatma kodonunda büyük bir delesyonun *oprD*'nin transkripsiyonunu engellediğini bildirmişlerdir.¹⁶³ Azalmış *oprD* ekspresyonu gösteren imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında *oprD* kodlayan bölgenin akış yukarısında IS1394 ve bir ISPa16-benzeri insersiyon (IS) elemanları tanımlanmıştır.^{37,164}

El Amin ve ark. *P. aeruginosa* klinik izolatları arasındaki *oprD* transkripsiyonunu, yapısal genin akış yukarı ve akış aşağı bölgelerinden amplifiye edilmiş iki takım primer kullanarak değerlendirmiştir.¹⁶⁰ İki *P. aeruginosa* suşu, akış yukarı primerlerdeki deneyde normal *oprD* transkripsiyon düzeyleri göstermiş, fakat akış aşağısındaki primerlerde *oprD* transkriptleri tespit edilememiştir. Dört suşta ise 2 primer takımında da ölçülen *oprD* transkript miktarının anlamlı farklar gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bu suşlarda transkripsiyonun prematür terminasyonu olduğu sonucuna varmış ve bunun yapısal gen dizisindeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.¹⁶⁰

Eser metallere çinko ve bakırın, *P.aeruginosa*'da *oprD* ekspresyonunu azaltarak imipenem direncine neden olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁵ Bu negatif regülasyon, metal direnç mekanizmasını aktive eden sırasıyla çinko ve bakır varlığında tepki

gösteren CzcR ve CopR düzenleyici proteinleri ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. CzcR ve CopR'nin her ikisinde tanımlanmamış faktörler aracılığıyla direk veya indirek olarak *oprD* transkripsiyonunu down regule ederler. Zayıf aromatik asit olan salisilatın tanımlanmamış bir mekanizmayla *oprD* transkripsiyonunu baskılayarak salisilata maruziyeti olan *P. aeruginosa* izolatlarında imipeneme dirence neden olduğu gösterilmiştir.⁸⁴

oprD transkripsiyonuna etkiyen mekanizmalardan en kompleks olanı *mexEF-oprN* atım pompasının ekspresyonu ile bağlantılı olanlardır. Bu ko-regulasyon mekanizmaları *P. aeruginosa*'nın çoklu direnç mekanizmalarının ekspresyonunu düzenleyebilme özelliğini göstermekte ve fenotipleri spesifik bir mekanizmadaki değişikliklere bağlamanın ne kadar zor olduğu konusunda bize fikir vermektedir.¹⁶⁵

OprD, transkripsiyon düzeyindeki mekanizmalardan farklı olarak dış membrandaki fonksiyonel bir porinin translasyonel yapımında bozulmaya yol açan mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir. Aktif bir porinin translasyonu ile ilgili OprD eksikliği mekanizmaları arasında çerçeve kayması ve prematür stop kodonları oluşturan mutasyonlar, insersiyonlar ve/veya delesyonlar vardır.⁶⁴ IS elemanlarının insersiyonuyla *oprD* yapısal geninin bozulması ise translasyonel yapımındaki bozulmayla ilgili gelişen direncin bir diğer mekanizmasıdır.¹⁶⁶

Karbapenemler üzerinde OprD ilişkili direnç iki yolla değerlendirilebilir. Birincisi MİK'lerdeki artışlarla ölçülen antibakteriyel potensine oransal etkisi, diğeri ise klinik etkisidir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada MİK'lerdeki artışlarla elde edilen verilere göre izogenik sokak suşu ve OprD'si eksik olan mutant suşlardaki OprD kaybının, *P. aeruginosa*'nın duyarlılığını meropenem 4-32 kat, imipenem 4-16 kat, doripenem 8-32 kat azalttığı gösterilmiştir.¹⁵⁹ Bu çalışmada OprD'si eksik olan mutantlardaki, meropenem potensine olan etki, diğer karbapenem potenslerine olan etkiden daha fazladır. Bu veri meropenemin *P. aeruginosa* dış membranından girmek için alternatif yollar kullandığını öne süren Perez ve ark.'nın sonuçlarıyla çelişmektedir.¹⁶⁷ Fakat Perez ve ark. çalışmalarında izogenik mutantları değerlendirmemiştir. Daha çok imipenem dirençli ve meropenem duyarlı fenotipteki birbiriyle ilişkisiz klinik izolatlarla çalışmışlardır. Bununla birlikte laboratuvar

üretilen izogenik mutantlarla yapılan deneyler özenle planlanmış olsa da klinik ortamın aynen kopyalanamayacağı akılda tutulmalıdır.

OprD ilişkili dirençte ikinci önemli nokta ise karbapenemlerdeki klinik etkisidir. OprD kaybı; imipenem duyarlılığı meropenem olduğundan daha az (MİK'lerdeki değişimlere bağlı olarak) etkileyebilir ancak bu direnç mekanizması imipenem MİK'lerini sıklıkla direnç sınır değerlerinin üzerine çıkartır. Sakyó ve ark.'nın bir çalışmasında OprD'si eksik olan 10 mutantın tümünde imipenem MİK değerleri 4 µgr/ml'nin üzerine çıkarak duyarlılıklarını kaybetmiştir. İmipenemdeki durumun tam tersi olarak meropenem MİK'leri 10 mutant suşun 4'ünde ve doripenem MİK'leri 10 mutant suşun 8'inde 4 µgr/ml'in altında kalmıştır.¹⁵⁹ Meropenem ve doripenem, imipenemin gösterdiğinden 4 kat daha fazla intrinsek potens gösterir.¹⁶⁸ O yüzden OprD eksikliğinin bu karbapenemlerin potensi üzerine olan etkisi, MİK'leri duyarlı sınır değerlerin üzerine her zaman çıkarmaz ve bu iki karbapenem dirençte ilave direnç mekanizmaları (atım pompası ve/veya karbapenemaz) gerekebilir.

İmipenem ve meropenem hem antipseudomonal etkinliği olan hem de β-laktamaz stabilitesi alışılmışın dışında olan β-laktam antibiyotiklerdir. Çoğu *Pseudomonas* izolatında farklı penisilin ve sefalosporin MİK'leri arasında sıkı bir bağlantı bulunurken *P. aeruginosa* izolatlarındaki imipenem MİK'leri diğer β-laktamlarınkiyle ilişkisizdir. Bunun sebebi olarak kromozomal AmpC derepresyonunun penisilin ve sefalosporin MİK'lerinin belirlenmesinde çok etkili bir faktörken, imipenem MİK'lerine etki etmemesi gösterilmiştir.¹⁶⁹ Bir başka yayında ise AmpC β-laktamazın karbapenemlerdeki intrinsek dirence etkisi tek başına çok düşük olsa da MexAB-OprM atım sistemi ile birlikteliğinde oldukça önemli olduğu bildirilmiştir.¹⁷⁰ Daha da önemlisi bu mekanizma penisilin ve sefalosporinin yanında kinolon, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi daha birçok antibiyotik sınıfının MİK'lerini güçlü bir şekilde etkiliyorken, imipenem MİK'leri çoğu *P. aeruginosa* izolatının eksprese ettiği geniş spektrumlu intrinsek dirençten etkilenmez.

İntrinsek direnç bütün *P.aeruginosa* izolatlarında değişen düzeylerde eksprese edilir ve bu izolatlar çoğu antibiyotiğe *Enterobacteriaceae*'dan daha az duyarlıdır. Bunun sebebi olarak uzun süre impermeabilite düşünüldü fakat

günümüzde impermeabilite ile birlikte çoklu ilaç atım pompalarının etkileşiminin gerekli olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁹ Çalışmamızda ikinci grupta incelenen izole karbapenem dirençli (imipenem MİK'i ≥ 16 ve meropenem MİK'leri değişken) 9 izolatanın 7'sindeki *oprD* mRNA düzeylerinde azalma, PAO1 referans suşla karşılaştırıldığında 4 izolatta anlamlı bulundu. Bu 4 izolattan birinde sadece *oprD* down regülasyonu görülürken *oprD* down regülasyonu ile eş zamanlı olarak 3 izolatta *mexB* aşırı ekspresyonu, 1 izolatta *mexD* aşırı ekspresyonu, 2 izolatta ise ampC aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. 50 klinik *P. aeruginosa* izolatu arasında imipenem dirençli 38 izolatta atım pompalarına ait genler; *mexD* 32 (%84), *mexB* 26 (%68), *mexY* 19 (%50), *mexF* 15 (%39) izolatta aşırı eksprese olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler impermeabilite ile çoklu ilaç atım pompalarının birlikteliği konusundaki literatürle uyumludur.

Meropenemin atım pompalarıyla etkileşimi imipenemden kısmen farklıdır. Meropenemin imipenem gibi OprD yolunu kullanabildiğini söyleyebiliriz fakat imipenemden farklı olarak meropenem MexAB-OprM'nin de bir substratıdır ve MexB aracılı atım tarafından da dışarı atıldığı bilinmektedir.¹⁶⁹ MexAB-OprM pompasının imipeneme karşı aktivitesinin olmamasının sebebi imipenemin meropenemin aksine heterosiklik yan zincire sahip olmamasıdır.¹⁷¹ İzolatların %78'inde meropeneme direnç görülen bir çalışmada MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexXY-OprM atım sistemlerinin aşırı ekspresyonu sırasıyla %28, %31, %37 bulundu.¹⁶² Bu çalışmadaki izolatların %60'ında atım sistemlerinden herhangi biri tespit edildiği için meropenem direncinde bu mekanizmanın katkısı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca meropenem dirençli izolatların tümünde OprD protein kaybı da belirlenmiştir.¹⁶² Çalışmamızdaki meropenem dirençli 35 (%70) izolat arasında MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM atım sistemlerinin aşırı ekspresyonu sırasıyla 25 (%71), 28 (%80), 16 (%46) ve 19 (%54) bulundu. Meropenem dirençli bu izolatlarımızın 33'ünde (% 94) atım sistemlerinden en az birinin tespit edilmesi ise meropenem direncinde bu mekanizmaların katkısını göstermektedir.

İmipenem ve meropenem arasındaki bu farklılıklar *P. aeruginosa*'daki dirence hangisinin daha az sebep olduğunu düşündürmektedir. İmipenem; bu antibiyotikle tedavi gören hastalarda OprD'si eksik olan mutantları seçmesine

rağmen bunlar diğer ilaçlara tamamen duyarlıdırlar. Meropenem direnci ise aynı zamanda MexAB-OprM pompasının up-regulasyonuna bağımlıdır ve bu mekanizma florokinolonlara ve diğer β -laktamlara direnci de belirlemektedir.¹⁶⁸ Meropeneme direnç gelişiminde OprD kaybı ve MexAB-OprM pompasının upregulasyonu rol oynadığından meropeneme direnç gelişimi imipeneme direnç gelişiminden daha zordur.⁵ Çalışmamızda 50 klinik *P. aeruginosa* izolatu arasında imipenem dirençli (MİK ≥ 16) olan 38 izolatu 30'u meropeneme dirençli (MİK ≥ 16) bulunmuştur. Cabot ve ark.'nın çalışmasında da meropenemin (%77 duyarlı) aktivitesi imipenemden (%68) daha yüksek bulunmuştur.¹⁴²

Aslında meropenem direncinde söylenebilecek en kuvvetli ihtimal imipeneme daha sık direnç gelişiyor olmasıdır. Antipseudomonal karbapenem olarak imipenem tercih edilmesi durumunda, büyük ihtimalle direnç gelişecek ve ardından bir sonraki antibiyotiğe ihtiyaç duyulacaktır. Bu durumda zamanla seleksiyon gelişecektir. Böyle ard arda kullanımlarda ilaca duyarlı bir bakteriyel popülasyonda çoklu dirence sahip mutant gelişme riski fazladır ve bu riskin azaltılması için daha ilk seferde kullanılacak ilacın bakterinin ancak çift mutasyon geliştirerek direnç geliştirebileceği bir ilaç olmalıdır.¹⁶⁹

İmipenem direnci ile *oprD* eksikliği arasındaki bağlantı birçok yayında bildirilmiştir. *oprD* ekspresyonu ile karbapenem duyarlılığı arasında literatürle uyumsuzluk gösteren suşların tanımlanması ise *P.aeruginosa* gibi genetik çeşitliliği ve çoklu direnç mekanizmalarını birlikte düzenleyebilme özelliği olan bir patojen için şaşırtıcı değildir.⁵

İmipenem duyarlılığı ile *oprD* ekspresyonu arasındaki uyumsuzluğa ilk örnek *P. aeruginosa* Tokai#1'den levofloksasin ile seçilen izogenik bir mutant olan *P. aeruginosa* 410L'dir. Tokai#1 suşu, *P. aeruginosa* PAO1'in izogenik bir mutantıdır ve levofloksasine ve imipeneme duyarlı değildir. Tokai#1'in imipenem MİK'i 8 $\mu\text{g/ml}$, PAO1 suşunda ise 1 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Duyarlılıktaki bu azalma *oprD* ekspresyon düzeyindeki 5 katlık azalma ile uyumludur. 410L mutant suşundaki *oprD* ekspresyonunda azalma daha fazladır; Tokai#1'deki düzeylere göre 3 kat ve PAO1'deki düzeylere göre 17 kat azalmıştır. *oprD* ekspresyonunda daha fazla azalma olmasına ve OprD'nin dış membranda tespit edilememesine rağmen mutant 410L

imipenem direncini kaybetmiştir ve orjinal PAO1'e benzer duyarlılık düzeyine geri dönmüştür.¹⁷²

İmipenem duyarlılığı ile *oprD* ekspresyonu arasındaki uyumsuzluğa gösterilebilecek ikinci örnek; imipenem aşırı duyarlı izogenik bir mutant olan *P.aeruginosa* 244-921C'dir. Bu örnek imipenem dirençli bir klinik izolat olan *P. aeruginosa* suş 244'den siprofloksasini kullanarak seçilmiştir.¹⁷³ *P. aeruginosa* 244'ün imipenem (MİK= 16 µg/ml) direnç mekanizmasında; premature bir stop kodon oluşturan bir baz değişimi sonucunda bütün OprD'nin translasyonunun engellendiği gösterilmiştir. Bu mutasyon izogenik 244-921C mutantında da devam etmiştir. Bu mutasyona bağlı olarak dış membranda aktif bir OprD porini bulunmamasına rağmen *P. aeruginosa* 244-921C'nin imipenem (MİK=2 µg/ml) duyarlılığında 8 katlık artış bulunmuştur.¹⁷³

Giske ve ark.'nın çalışmasında 27 karbapenem dirençli izolatın çoğunda düşük düzey *oprD* mRNA bulunduğu ve normal miktarda *oprD* mRNA bulunan karbapenem dirençli 6 izolatın 3'ünde anlamlı *oprD* sekans değişiklikleri görüldüğü bildirilmiştir.¹⁷⁴ Bir başka çalışmada ise imipenem duyarlı 4 izolatta *oprD* mRNA' da anlamlı azalma bulunmuş ve bu izolatlarda çerçeve kayması veya translasyonel durmaya neden olan *oprD* mutasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca *oprD* mRNA düzeylerinin imipenem direnç düzeyiyle her zaman korele olmadığı ve farklılıkların *oprD* değişiklikleriyle veya atım pompa genleriyle açıklanamayacağı bildirilmiştir.¹⁶⁰ Bununla birlikte azalmış *oprD* transkripsiyon düzeyi olan izolatlarda da normal miktarlarda OprD olabileceği daha önceden gösterilmiştir.⁶⁴ Bizim çalışmamızda da 50 klinik *P. aeruginosa* izolatı arasından imipenem dirençli 38 izolatın 9'unda *oprD* mRNA düzeylerinde artış görülmüştür.

İmipenem duyarlılığı ile *oprD* ekspresyonu arasındaki bu uyumsuzluk *P. aeruginosa*'da karbapenemlerin etkileşimleriyle ilgili hala bilinmeyenler olduğunu göstermektedir. Bu suşlardaki imipenem artmış duyarlılıktan sorumlu mekanizmalar hala açıklanamamıştır fakat bu mekanizmaların tanımlanması, karbapenemlerin etkisini arttıran tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

P. aeruginosa'da karbapenemlere direnç MexAB-OprM atım pompasının aşırı ekspresyonu sonucu meydana gelebilir. Bu atım pompası kinolonları ve β -laktamları (imipenem hariç) dışarı atabilmektedir. İmipenem etkisiz oluşunu aşırı üretim yapan mutantlardaki meropenem MİK değerlerinde artış görülmesine rağmen imipenem MİK değerlerinde artış olmaması açıklamaktadır.⁵ Cabot ve ark.'nın çalışmasında¹⁴² meropenem dirençli izolatlar arasında atım pompa genlerinden en fazla sıklıkta *mexB* aşırı ekspresyonu bildirildi. Bir başka çalışmada ise, *mexB* aşırı eksprese eden izolatların %62.5'inde meropenem direnç, %90'ında ise *oprD* ekspresyonunda azalma görüldü. *mexB* aşırı eksprese eden bütün meropenem duyarlı izolatlarda ise *oprD* ve *ampC* ekspresyonu PAO1 ile karşılaştırıldığında normal bulundu.⁷ Çalışmamızdaki izole karbapenem dirençli 9 izolattan (imipenem MİK \geq 16) 5'inde *mexB* aşırı ekspresyonu belirlendi. Bu 5 izolattan 3'ünde meropenem MİK değerleri \geq 16 ve eş zamanlı olarak *oprD* düzeylerinde anlamlı şekilde azalma belirlendi. İzole karbapenem dirençli 9 izolattın 7'sinde *oprD* miktarındaki azalma ile imipenem ve meropenem MİK değerlerinde görülen eş zamanlı artış, *oprD*'nin karbapenem direncindeki etkisini kuvvetle desteklese de atım pompalarının aşırı ekspresyonlarının da eş zamanlı olarak görülebilmesi direnç gelişimindeki sinerjistik etkiyi düşündürmektedir.

Giske ve ark.¹⁷⁴ meropenem dirençli 23 izolatın 16 tanesinde *mexB*'nin transkripsiyonunda artış gözlediği çalışmalarında meropenem dirençli izolatlarda *mexB* transkripsiyonunda çoğu kez artış olduğunu bildirmişlerdir. 27 karbapenem dirençli izolatta MexAB-OprM ve MexCD-OprJ atım pompalarını inceledikleri çalışmada, 8 meropenem dirençli izolatta *mexB*'de ve *mexD*'de artış görülmemiş fakat bu izolatların 3 tanesi atım pompa inhibisyon testinde pozitif bulunmuştur ki bunun sonucunda başka atım pompalarının bu izolatlarda aktif olabileceği sonucuna varılmıştır. Geriye kalan 5 izolatın 2 tanesinde yüksek düzey meropenem direnci gözlenmiş ve bunlarda azalmış *oprD* transkripsiyonundan başka bir direnç mekanizması tespit edilmemiştir.

Çalışmamızdaki meropenem dirençli 35 (%70) izolat arasında 25'inde (%71) *mexB* aşırı ekspresyonu görüldü. 4 izolatta ise *mexB*'de sınırdaki ekspresyon (PAO1'in 2-3 katı artış) görüldü. *mexD*, *mexF* ve *mexY* genlerinin aşırı ekspresyonu ise sırasıyla 28 (%80), 16 (%46) ve 19 (%54) izolatta tespit edildi. Meropenem dirençli

35 (%70) izolat arasında *mexB* aşırı ekspresyonu tespit edilmeyen 6 izolatın 5'inde *oprD* ekspresyonu anlamlı şekilde düşük tespit edildi. *oprD* down regulasyonu görülmeyen izolatta ise araştırdığımız genlerden sadece *mexD* aşırı ekspresyonu görüldü. Sınırdaki ekspresyon tespit ettiğimiz 4 izolattan 3'ünde de *oprD* ekspresyonu anlamlı şekilde düşük tespit edildi. *oprD* down regulasyonu görülmeyen izolatta da sadece *mexD* aşırı ekspresyonu tespit edildi.

mexB transkripsiyonundaki artışın genel olarak meropenem direnciyle oldukça ilişkili bulunduğu bir çalışmada, *mexB* mRNA'da anlamlı bir değişiklik göstermeyen yüksek düzey meropenem dirençli bir izolatın dizi analizinde *nalB* mutasyonu gösterilmiştir.¹⁶⁰ *mexB* mRNA'da daha yüksek bir artış olması beklenen bu izolatta incelenen diğer atım pompa genlerinden *mexF* ve *mexY* aşırı ekspresyonu da tespit edilmemiş ve atım pompa inhibitörünün de etkisine rastlanılmamıştır. Bu bulgulara bakıldığında çoğu izolatın muhtemelen birkaç direnç mekanizmasına sahip olduğu ve böyle izolatlarda atım ilişkili direncin bu mekanizmalardan sadece bir tanesi olabileceği sonucuna varmışlardır.¹⁶⁰ Yalnız imipeneme dirençli olan ve *mexR* mutasyonu bulunmayan bir suşta ise artmış *mexB* transkripsiyonu bulunmuştur. Fakat bu suştaki meropenem MİK değeri beklenmeyecek kadar düşük tespit edilmiştir (MİK: 1 µg/ml). Bu izolatta görülen yüksek *mexB* transkripsiyon düzeyiyle ilgili mRNA'nın mutasyonel olarak defektif olması ve fonksiyonel olarak anormal MexB yapması ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir.¹⁶⁰ Alternatif olarak bu izolatta meropenem için alternatif bir giriş kapısı olabilir. *P. aeruginosa*'da meropenem girişi için bazı porinlerin varlığı bildirilmiştir.¹⁷⁵ Ayrıca *P. aeruginosa* genomunun analizi OprD veya OprE'nin her ikisiyle de anlamlı homolojileri paylaşan 14 açık okuma penceresinin (ORF) varlığını göstermiştir.¹⁷⁶

mexAB-oprM ekspresyonuna ilişkin iki özellik gösterilmiştir. Birincisi, *mexAB-oprM*'nin üreme fazı bağımlı ekspresyonudur.¹⁷⁷ Üreme döngüsü ilerledikçe ve hücre yoğunluğu arttıkça, geç log faz/erken sabit fazda maksimum ekspresyon oluşana kadar *mexAB-oprM* transkripsiyonu da artar. Üreme fazı bağımlı up-regulasyonun bir quorum sensing sinyali gerektirdiği ileri sürülmektedir. Hücreler arası sinyal gönderme, homoserin lakton molekülleri olarak bilinen diffuze olabilen indükleyiciler aracılığıyla olur. *N*-Butiril-L-homoserin lakton (C₄-HSL), *rhl* quorum

sensing sisteminin bir parçası olarak sentez edilir ve bunun *mexAB-oprM*'nin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.^{178,179}

mexAB-oprM ekspresyonuyla ilişkili gösterilen ikinci özellik; OMF geni *oprM*'nin *mexAB*'den bağımsız eksprese edilmesidir. *mexB* kodlayan bölgede *oprM*'nin akış yukarısında zayıf bir promoter bulunmuştur. Bu promoterin *mexA* akış yukarısındaki promotere göre daha az aktif olduğu ve bütün transkriptin sadece küçük bir parçasına katkısı olduğu ileri sürülmektedir. OprM; MexXY, MexJK, MexVW ve MexMN sistemlerinde ve muhtemelen diğer RND pompalarında OMF görevi görebilir. *mexAB-oprM*'nin C₄-HSL ilişkili üreme fazı düzenlemesi *mexR*'den bağımsız olarak meydana gelir.⁵

mexCD-oprJ'nin ekspresyonu, *nfxB* geninin ürünüyle kontrol altında tutulur, bu gen *mexCD-oprJ* ekspresyonunu negatif yönde düzenler. *nfxB*'deki mutasyonların; NfxB'nin baskılayıcı aktivitesini değiştirerek *mexCD-oprJ*'nin aşırı ekspresyonuna sebep olduğu ileri sürülmektedir; bunlara da *nfxB* tipi mutantlar denilmektedir. Laboratuvar ve klinik izolatlarda *nfxB*'de baz yer değiştirmeleri, delesyonlar ve bir IS elemanı ile kesintiler gibi çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır.⁷⁸ *P. aeruginosa*'da Tip A ve B olmak üzere farklı MexCD-OprJ üretim düzeyi ve farklı duyarlılığı olan 2 çeşit aşırı ekspresyon yapan mutant tanımlanmıştır. Tip B mutantları daha fazla miktarda MexCD-OprJ üretirler ve duyarlılıkta tip A mutantlarının yaptıklarından daha önemli değişiklikler meydana getirirler.¹⁸⁰ *mexCD-oprJ* ekspresyonunun düzenlenmesi NfxB ile sınırlandırılmayabilir. PAO1'in *mexAB-oprM* ve *oprM* delesyonu olan türevlerinde *mexCD-oprJ* ekspresyonunda önemli düzeyde artış olması MexAB-OprM'in *mexCD-oprJ* ekspresyonuna etki ettiğini düşündürmektedir.⁸¹ MexAB-OprM olmayan suşlardaki *mexCD-oprJ* up regulasyonundan sorumlu mekanizma daha belirlenmemiştir. Florokinolonlar, β-laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklin, novobiyosin, trimetoprim ve makrolidler MexCD-OprJ pompasının substratlarıdır.⁵

Giske ve ark.'nın 27 karbapenem dirençli izolatın çoğunda *mexD* düzeyini düşük buldukları çalışmada sadece 2 izolatta aşırı ekspresyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte başka bir çalışmada¹⁷⁴ ise karbapenem dirençli izolatlarda MexXY-OprM (%37,5)'den sonra ikinci sıklıkta MexCD-OprJ (%31) aşırı ekspresyonu

görülmüştür. Oh ve ark.¹⁸¹ florokinolon dirençli 20 *P.aeruginosa* izolatından 5'inde *mexD* aşırı ekspresyonu tespit etmiş ve suşların tümünde topoizomerazdaki mutasyonlarla açıklanamayan yüksek florokinolon MİK değeri olması sebebiyle *mexCD* aşırı üretiminin antibiyotik direnci üzerine etkisini anlamlı bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise *mexD* aşırı ekspresyonu izole kinolon dirençli 4. gruptaki izolatların tümünde tespit edilmiştir. Ayrıca yalnız kinolon ve karbapenem dirençli 3. grupta incelenen genlerden *oprD*, *mexB* ve *mexF* genlerinde sadece birer izolata anlamlı değişiklik, *mexD* aşırı ekspresyonunun ise tüm izolatlarda tespit edilmesi kinolon direnciyle bu pompanın ilişkili olduğunu göstermektedir. 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 44'ünde (%88) *mexD* aşırı ekspresyonu belirlenmiştir.

P. aeruginosa PAO1 suşlarında MexCD-OprJ çoklu ilaç atım pompa indüksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada MexCD-OprJ'nin önemli dezenfektanlarla indüklendiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar dezenfektanların sık olarak kullanıldığı hastanelerde MexCD-OprJ'nin *P. aeruginosa*'daki intrinsek çoklu ilaç direncinde önemli rol oynadığını göstermiştir.¹⁸² Klinikle ilişkili biosidler MexCD-OprJ'yi indüklediğinden *P. aeruginosa*'da kullanılan antibiyotiklere direnci de arttırmaktadır. Muhtemelen bunun dışında çeşitli bileşenlerde *mexCD-oprJ* operonunu indükleyebilir. Bu nedenlerden dolayı MexCD-OprJ, MexAB-OprM ve MexXY-OprM'e ilave olarak *P. aeruginosa*'da kinolonlara ve diğer antibakteriyel ajanlara dirençte önemli bir rol oynayabilir. Çalışmamızda da çoklu ilaca dirençli 22 izolatın 20'sinde ve izole kinolon dirençli yedi izolatın tümünde *mexD* aşırı ekspresyonu tespit edildi.

mexCD-oprJ aşırı ekspresyonu bazı antibakteriyel ilaçlara karşı dirençten sorumluyken, aminoglikozidlere ve diğer β -laktamlara karşı yüksek duyarlılıkta gözlenir. Duyarlılıktaki 4 kat ve üzeri artış yüksek duyarlılık olarak tanımlanır ve yüksek duyarlılığın düzeyi MexCD-OprJ üretim düzeyiyle alakalıdır.⁷⁸ Masuda ve ark. Tip B mutantlarının (yüksek MexCD-OprJ üretimi) Tip A mutantlarına göre (orta derece MexCD-OprJ üretimi) duyarlılıkta daha fazla artış sergilediğini göstermişlerdir.¹⁸⁰ Bununla birlikte yüksek duyarlılıktan sorumlu mekanizmalar, MexCD-OprJ üretimiyle alakalı olanlardan daha komplekstir. *mexCD-oprJ* aşırı eksprese eden mutantlarla yapılan fenotipik çalışmalar; bazı antibiyotiklere karşı yüksek duyarlılığın *mexCD-oprJ* aşırı ekspresyon düzeyiyle her zaman ilişkili

olmadığını göstermiştir.⁵ Ayrıca bütün antibiyotiklere karşı yüksek duyarlılık tek bir mekanizmayla açıklanamaz ve imipeneme karşı yüksek duyarlılıktan sorumlu mekanizmalar henüz tanımlanamamıştır.

Laboratuvar üretimi *nfx-B* tipi mutantlarının karbenisilin ve aztreonama (MexAB-OprM'nin substratları) karşı yüksek duyarlılığı, önceleri MexAB-OprM üretiminin aynı zamana rastlayan down regülasyonuna bağlanmıştır. Bununla birlikte *nfx-B* tipi klinik izolatların analizi boyunca, *mexB* transkripti ve MexB protein düzeyleri, bu ilaçlara karşı aşırı duyarlılığa rağmen down regüle olmamıştır. Buna karşılık bu suşlarda MexAB-OprM pompa aktivitesindeki bir azalma mekanizma olarak ileri sürülmüştür. Bu sonuçlara göre, *oprM*'nin transkripsiyonu *mexAB*'ninkinden bağımsız olabildiği için, muhtemel bir *mexCD-oprJ* ve *oprM* ekspresyonunun ko-regülasyonu mutlaka dikkate alınmalıdır.⁵

MexCD-OprJ aşırı üreten mutantlar; sulbenisilin, sefpodoksim, seftriakson, imipenem ve biapeneme aşırı duyarlı hale gelir, fakat bu ilaçlardan hiçbiri MexAB-oprM tarafından dışarı atılmamaktadır. AmpC'nin indüksiyon yolundaki bir aksamanın bu β -laktamlara aşırı duyarlılığa neden olduğu ileri sürülmektedir.¹⁸³ İmipeneme aşırı duyarlılıktan sorumlu mekanizmalar tanımlanamamıştır. Bazı araştırmacılar¹⁸³ imipenem aşırı duyarlılığının *ampC* indüksiyonundaki bir aksama sonucu olduğunu ileri sürmüş olsalarda, AmpC aşırı yapımının imipenem MİK'lerinde anlamlı artış yapmadığını gösteren çalışmalar^{158,164} bu hipotezin aleyhindedir. Ayrıca aşırı duyarlı mutantlar *oprD* ekspresyonunda veya dış membrandaki OprD proteininde herhangi bir değişiklik göstermediği için, imipenem aşırı duyarlılığının OprD düzeyiyle ilişkisiz olduğunu göstermiştir.¹⁷³ *mexCD-oprJ* aşırı eksprese eden *P. aeruginosa* suşlarındaki imipenem aşırı duyarlılığından sorumlu mekanizmaların aydınlatılması potansiyel ilaç hedeflerinin ortaya çıkarılmasıyla karbapenemlerin etkinliğini arttırabilir.

Aminoglikozidlere aşırı duyarlılıktan sorumlu mekanizmalar bilinmemektedir. Önceden tartışıldığı gibi aminoglikozidler MexXY atım pompasının substratlarıdır ve MexCD-OprJ aşırı üreten suşlarda mexXY supresyonu ileri sürülmektedir fakat bu ters ilişki klinik izolatlarda gözlenmemiştir.⁵

MexEF-OprN substratları olarak florokinolonlar, kloramfenikol ve trimetoprim bildirilmiştir. Kompleks bir ko-regulatör yol olan MexEF-OprN atım pompasının aşırı yapımı ile OprD porininin down regulasyonunun veya up regulasyonunun eş zamanlı olduğu yolda florokinolon ve karbapenemlerin her ikisinin potensine etki eden mutasyon meydana gelir. Günümüzde *P. aeruginosa*'da MexEF-OprN ve OprD'nin ko-regulasyonu ile direkt veya indirek bağlantılı olarak 3 protein; MexT, MexS ve MvaT tanımlanmıştır.⁵

MexT aracılığıyla *mexEF-oprN* aşırı eksprese eden *P. aeruginosa* suşları, atım pompasının substratları olan antibiyotiklere dirençli hale gelir. Fakat bu suşlar MexEF-OprN atım pompası tarafından çıkarılmayan imipeneme de duyarlılığını da kaybederler. Daha doğrusu, imipeneme olan duyarlılığın kaybı, eş zamanlı olan *oprD* ekspresyonunda ve OprD'de azalmayla ilişkilidir.^{81,84} Atım pompasının aşırı ekspresyonu ile porin kaybı arasındaki bağlantı için MexT ile koregulasyon gerekmektedir. Çalışmalar MexT'nin tek başına, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde *oprD*'yi down regule edebildiğini ve OprD miktarında anlamlı bir azalmaya yol açabildiğini göstermiştir.^{83,84} Çalışmamızda incelenen izole kinolon dirençli 12 izolattaki *oprD* miktarı 6 izolatta azaldı ve bunların 3'ü anlamlı bulundu. Fakat bu 3 izolat şaşırtıcı olarak imipeneme duyarlı bulundu (MİK=2 µg/ml). 12 izolatın 7'sinde *mexF* aşırı ekspresyonu, 4 izolatta sınırdaki ekspresyon belirlendi. Sadece bir izolatta *mexF* aşırı ekspresyonu bulunmadı. Tüm izolatların 23'ünde (%46) *mexF* aşırı ekspresyonu belirlendi. 5 izolatta ise sınırdaki ekspresyon belirlendi. *mexF* aşırı ekspresyonu olan 23 izolat arasında ise 9 izolatta *oprD* down regulasyonu bulundu ve 8 izolatta *oprD* miktarı tespit edilemedi. Bu ko-regulasyon mekanizması ile ilgili diğer çalışmalar, transkripsiyonun prematur terminasyonunun veya transkript stabilitesindeki değişikliklerin, *oprD* transkript düzeyindeki azalmadan sorumlu olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, *oprD* ekspresyonundaki MexT aracılı azalmada *oprD* promoterinde transkripsiyon başlatmasında azalma olması gerektiği bildirilmiştir.¹⁸⁴

mexS'deki mutasyonlar, eş zamanlı olarak *mexEF-oprN* aşırı ekspresyonu ve *oprD* ekspresyonunun down regulasyonu ile ilişkilidir. MexEF-OprN'nin regulasyonunda yukarıda tartışıldığı gibi, MexS'nin inaktivasyonu ile MexT için efektör molekül vazifesi gören ve aktivasyonu takiben *oprD* ekspresyonunun down

regulasyonuna aracılık eden metabolitlerin oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir.⁸⁶ *oprD* ekspresyonunun MexT ilişkili down regulasyonu ile MexS ilişkili down regulasyonu karşılaştırıldığında global regülatör MvaT'nin inaktivasyonu hem *MexEF-OprN* hem de *oprD* transkripsiyonunda bir up regulasyona neden olur.⁸⁸ Ancak *oprD* upregulasyonundan sorumlu mekanik yol tanımlanmamıştır.

mexEF-oprN ekspresyonunun MexT (*mexS* inaktivasyonu ile veya *mexS* inaktivasyonu olmadan) ve MvaT ile regulasyonu, *oprD* ko-regulasyonu ile imipenem duyarlılığına etki edebilir. Fakat *mexEF-oprN* ve *oprD*'nin ko-regulasyonu her zaman gözlenmez. Örneğin yakın zaman önceki bir çalışmada, *mexEF-oprN*'yi aşırı eksprese eden izogenik bir mutant, imipenem duyarlılığında, *oprD* transkript düzeylerinde veya dış membrandaki OprD düzeylerinde hiçbir değişiklik göstermemiştir. *mexT*, *mexS* ve *mvaT* regülatör genlerinin dizi ve ekspresyon analizinde, mutantta her hangi bir genetik değişiklik görülmemesi eş zamanlı *oprD* regulasyonu olmadan *mexEF-oprN* regulasyonunun alternatif bir yolu olduğunu akla getirmektedir.¹⁸⁵ Son zamanlardaki çalışmalar *P. aeruginosa*'da *mexEF-oprN*'nin regulasyonunun daha kompleks olduğunu ve daha tanımlanmamış yollarının olduğunu ileri sürmektedir.⁵

AmpC ve atım pompalarının aşırı ekspresyonunun etkisinin ve prevalansının değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada 190 *P. aeruginosa* izolatu incelendi.¹⁴² En sık (%24) rastlanılan mekanizma AmpC aşırı ekspresyonu bulundu. Piperasilin-tazobaktam ve seftazidime dirençli izolatların çoğunda (sırasıyla %96 ve %84) AmpC aşırı ekspresyonu görüldü. AmpC aşırı ekspresyonunun prevalansı sefepim (%52) ve meropenem (%60) gibi diğer β -laktamlara dirençli izolatlarda da yüksek bulundu. Bunun yanında florokinolon ve aminoglikozid dirençli suşlarda atım pompa aşırı ekspresyonuyla AmpC aşırı ekspresyonu arasındaki bağlantı anlamlı bulundu. Siprofloksasin dirençli izolatların %52'sinde AmpC aşırı ekspresyonu tespit edildi. Tobramisin dirençli izolatlar arasındaki AmpC aşırı ekspresyonunun prevalansı %63 bulundu.

Bizim çalışmamızda ise 50 klinik *P. aeruginosa* izolatının 23'ünde (%46) AmpC aşırı ekspresyonu görüldü. AmpC aşırı ekspresyonu görülen suşların %91'i

(n=21) birinci gruptaki çoklu ilaca dirençli grupta görüldü. Geri kalan suşlar ise izole karbapenem dirençli grupta rastlanıldı. Fakat üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli 7 izolatta ve dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli 12 izolatta aşırı ekspresyon görülmedi. Çalışmamızdaki oranlara baktığımızda AmpC aşırı ekspresyonunun %91'ini oluşturan grupta antipseudomonal β -laktamlara ve aminoglikozidlere dirençli izolatların olması önemlidir. İzole kinolon dirençli grupta aşırı ekspresyon görülmemesi ise AmpC'nin kinolon direncinde etkisi olmadığını düşündürmektedir.

AmpC aşırı yapımı sonucunda çoğu β -laktama direnç geliştirirken *P. aeruginosa*'daki AmpC ile karbapenem duyarlılığı arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammıştır. *P. aeruginosa*'nın allel değişimiyle oluşturulan AmpC olmayan suşları, imipenem ve panipenem duyarlılığında (meropenem hariç) 4 katın üzerinde olan anlamlı bir artış göstermiştir.⁷¹ Fakat AmpC olmayan *P. aeruginosa* izolatları hala AmpC üretmekte ve de imipenem ve doripenem duyarlılığında (meropenem hariç) artma göstermektedir.^{158, 186} Bu veriler *P. aeruginosa*'nın karbapenemlerdeki intrinsek duyarlılık düzeyine AmpC'nin bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Tam tersine, yayınlanmış veriler *P. aeruginosa* izolatları arasında karbapenem direnci gelişiminde, AmpC aşırı üretiminin fark edilebilir bir rol oynamadığını ileri sürmektedir. β -laktamlarla seçilen izogenik mutantlar arasındaki AmpC aşırı yapımı, *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere duyarlılığını anlamlı derecede düşürmemektedir.^{158,173,186} Bunun yanında *P. aeruginosa*'nın karbapenem duyarlı klinik izolatlarında AmpC aşırı yapımı bildirilmiştir. AmpC aşırı üreten 47 klinik izolatın olduğu bir çalışmadaki veriler, sadece 7 tanesinin (%15) imipeneme dirençli olduğunu göstermiştir.¹⁸⁷ Gutierrez ve ark. yakın zaman önceki çalışmalarında, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarının %51'inin AmpC aşırı üretimi yaptığını bildirmişlerdir. İstatistiksel analizler meropenem dirençli suşlarda AmpC aşırı üretiminin, meropenem duyarlı suşlara göre daha muhtemel olduğunu ileri sürdüğü halde, Gutierrez ve ark. meropeneme dirençte AmpC aşırı üretiminin yeterli olmadığı aynı zamanda AmpC aşırı üretimine gerek de olmadığı sonucuna varmışlardır.⁵

AmpC aşırı üretimi ile karbapenem direnci arasındaki bağlantıyla ilgili asıl problem, *P. aeruginosa* direnç mekanizmalarının birbirleriyle kompleks etkileşimiyle ve ko-reguluar yollarıyla ilgili bilgilerimizin yeterli olmamasıdır. Şimdiye kadar

elde edilen veriler, AmpC aşırı üretiminin *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere olan duyarlılığını tek başına anlamlı olarak düşürmediğini fakat ilave direnç mekanizmaları (atım pompa aşırı üretimi, azalmış OprD ve/veya sınıfA/sınıfB karbapenemaz üretimi) ile eşlik ettiğinde elbette ki dirence katkıda bulunabildiğini ileri sürmektedir. Bunun dışında daha ilginç olan şey ise, kromozomal kaynaklı AmpC enziminin (genişlemiş spektrumlu varyantları) mutasyonel varyantlarının *P. aeruginosa*'ya karbapenem direnci sağlamasıdır.¹⁸⁸ Genişlemiş spektrumlu AmpC'ler ilk defa *Serratia marcescens* ve *Enterobacter* spp.'de tanımlanmıştır ve daha sonrasında *E. coli*'de tanımlanmıştır. Bu enzimlerin aktif bölgelerinin yanındaki aminoasit değişiklikleri, sefepim, seftazidim ve imipeneme karşı hidrolitik aktivitede artışa yol açabilir. Ancak bu enzimlerin artmış katalitik aktiviteleri sadece sefepime ve imipeneme duyarlılığı azaltır. Sefepim ve/veya karbapenem direncinde bu genişlemiş spektrumlu AmpC'lerin aşırı yapımının gerekli olduğu düşünülmektedir.⁵

P. aeruginosa'daki AmpC aşırı üretiminin klinik etkisini değerlendirmek çoklu direnç mekanizmalarının kompleks etkileşimi dolayısıyla zordur. Bununla birlikte, Tam ve ark. *P. aeruginosa* bakteriyemisi olan hastaları, izole edildikleri suşlardaki AmpC üretimine göre iki gruba ayırarak incelemişlerdir. AmpC aşırı üretimi olan suşların izole edildiği hastalarda ampirik tedavideki yanlış antibiyotik kullanımı, AmpC aşırı üretimi olmayan suşların izole edildiği hastalara göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur.¹⁸⁹ Ayrıca AmpC aşırı üretimi olan hastalarda çoğu kez persistan bakteriyemi (%45'e karşılık %6) olması, AmpC aşırı üreten *P. aeruginosa* izolatlarının hızlı identifikasyonunun ve AmpC aşırı üretim mekanizmalarıyla ilgili çalışmaların gerekliliğini göstermektedir.

Tedavi esnasında dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının ortaya çıkabilme özelliği büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu durumda hastalar, AmpC ilişkili direnç gelişip tedavi başarısız olana kadar, ilk duyarlılık verilerine göre uygun bir β -laktamla tedavi edilir. Bu durum antipseudomonal penisilinler, penisilin-inhibitor kombinasyonları, aztreonam ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi edilen hastaların %14 ila %56'sında gözlenmiştir. Direnç gelişimi veya klinik başarısızlık çoğunlukla üriner sistem dışındaki enfeksiyonlarda ve altta yatan Kistik Fibroz ve nötropenili hastalarda gözlenir. Bir antipseudomonal β -laktamla bir aminoglikozid kombinasyonu, AmpC-ilişkili direncin gelişimini önlemede bir strateji olmanın

yanında, her zaman bu amaç için efektif değildir.⁵ AmpC ilişkili dirençle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesinde öncelikle yapılması gereken bu direnç mekanizmalarının ekspresyonunun hangi mekanizma ile düzenlendiğinin açıklanması olmalıdır.

Klinik izolatlardaki direnç mekanizma çeşitlerine göre bazı izolatlar hala herhangi bir tanımlanmış mekanizmayı göstermemektedir. Yüksek düzey dirençli izolatlarda çeşitli mekanizmaların sinerjistik etkisiyle oluşan direnç genlerindeki değışikliklere bakarak incelediğimiz fenotip, izolatın genetik kökenini bütünüyle temsil etmeyebilir.

Antibiyotik duyarlılıklarının ülke ve bölgeler hatta hastaneler arasında farklı zamanlarda değışebileceğı unutulmamalıdır. Direnç gelişiminin sürekli izlenmesi ve duyarlılık eğilimlerinin belirlenmesi tedavi politikalarının oluşturulmasında faydalı olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1-Çalışmaya dahil edilen izolatların tümünde İBL üretimi saptanmıştır.

2-Tüm izolatların %66'sı (n=33) yoğun bakım ünitelerinden elde edilmiştir. İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımlarına bakıldığında % 52'sinin solunum sistemi örneği olduğu tespit edilmiştir.

3-Çalışmamızdaki izolatlar arasında en etkili antibiyotiğin piperasilin-tazobaktam (% 82 duyarlı) olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde amikasine de yüksek duyarlılık (%76) saptanmıştır. Siprofloksasine ve levofloksasine duyarlılık oranı ise %18 olarak bulunmuştur.

4-Tüm klinik *P. aeruginosa* izolatları arasından imipenem dirençli 38 izolatta atım pompalarına ait genler; *mexD* 32 (%84), *mexB* 26 (%68), *mexY* 19 (%50), *mexF* 15 (%39) izolatta aşırı eksprese olarak tespit edilmiştir.

5-İmipenem dirençli 38 izolattaki *oprD* ekspresyonu ise 16 (% 46) izolatta anlamlı olarak azalmış ve dokuz (%26) izolatta tespit edilememiştir. İzole karbapenem dirençli dokuz izolatın yedisinde *oprD* miktarındaki azalma ile imipenem ve meropenem MİK değerlerinde görülen eş zamanlı artış, *oprD*'nin karbapenem direncindeki etkisini kuvvetle desteklese de atım pompalarının aşırı ekspresyonlarının da eş zamanlı olarak görülebilmesi direnç gelişimindeki sinerjistik etkiyi düşündürmektedir.

6-Çalışmamızdaki meropenem dirençli 35 (%70) izolat arasından 25'inde (%71) *mexB* aşırı ekspresyonu görülmüştür. Dört izolatta ise *mexB*'de sınırdaki ekspresyon görülmüştür. *mexB* aşırı ekspresyonu tespit edilmeyen altı izolatın beşinde ve sınırdaki ekspresyon tespit ettiğimiz dört izolattan üçünde de *oprD* ekspresyonu anlamlı

şekilde düşük tespit edilmiştir. Meropenem dirençli izolatların 16'sında (% 46) oprD anlamlı olarak azalmış, dokuzunda (%26) ise tespit edilememiştir. Sonuç olarak izolatlarımızda *mexB* transkripsiyonundaki artış ve oprD ekspresyonundaki azalma meropenem direnciyle oldukça ilişkili bulunmuştur.

7-Çalışmamızda 50 klinik *P. aeruginosa* izolatu arasında imipenem dirençli olan 38 izolatin 30'u meropenem dirençli bulunmuştur. Meropeneme direnç gelişiminde OprD kaybı ve MexAB-OprM pompasının aşırı ekspresyonu rol oynadığından meropeneme direnç gelişimi imipeneme direnç gelişiminden daha zor olduğu bilinmektedir.

8-Çalışmamızda *mexD* aşırı ekspresyonu yalnız kinolon ve karbapenem dirençli 3. grup ve izole kinolon dirençli 4. gruptaki izolatların tümünde tespit edilmiş ve MexCD-OprJ atım pompası kinolon direnciyle ilişkili bulunmuştur.

9-Üçüncü gruptaki izole kinolon dirençli izolatlar karbapenemlere duyarlı bulunmasına rağmen izolatların yarısında *oprD* ekspresyonu düşük bulunmuştur. Dördüncü gruptaki yalnız kinolon ve karbapenem dirençli grupta ise sadece iki izolatta *oprD* ekspresyonunda azalma gözlenmesine rağmen izolatların tümü imipeneme dirençli bulunmuştur. Sadece bu iki grupta elde edilen veriler kinolon ve karbapenem direnç mekanizmaları arasında etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Kinolon varlığında oprD ekspresyonunun etkilendiği ve imipenemin hücre içine girişte başka yollar kullandığını göstermektedir. Bu bağlamda kinolon ve karbapenem kombinasyon tedavisinin gereksiz ilaç kullanımına dolayısıyla maliyetin artmasına neden olacağı ve akılcı bir tedavi protokolü olmayacağı kanaatine varılmıştır.

10-Çoklu ilaç dirençli grubun %95'inde, izole karbapenem dirençli grubun ise %20'sinde *ampC* aşırı ekspresyonu tespit edilmesi diğer β -laktam ilaçlarla kıyaslandığında imipenem ve meropenemin β -laktamaza dayanıklı olduğunu ve antipseudomonal β -laktam olarak uygun olduğunu göstermektedir.

11-Yalnız karbapenem ve kinolon dirençli 3. grupta ve izole kinolon dirençli 4. grupta *ampC* aşırı ekspresyonu saptanmamıştır. Dolayısıyla en önemli direnç mekanizmalarından *ampC* β -laktamazın kinolon direncinde etkisi olmadığı ve kinolonların antipseudomonal ilaç olarak kullanımının uygun olacağı düşünülmüştür.

12- Çalışmamızda 50 izolat arasındaki *oprD* down regulasyonunu, atım pompa ve *ampC* aşırı ekspresyonlarını gösteren genlerin görülme sıklığı sırasıyla *mexD* (%88), *mexB* (%76), *mexF* (%46), *ampC* (%46), *mexY* (%40), *oprD* (%38) olarak belirlenmiştir.

13-İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi gösterebilmek için kullandığımız AP-PCR yöntemiyle 18 farklı patern tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- ¹ Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. (2007). *Pseudomonas*, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH (Eds): *Manuel of Clinical Microbiology*, 9.th ed, p.734-748, ASM Press, Washington, DC.
- ² Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. (1998). Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*, 4:242–247.
- ³ Pechere, JC& Kohler T. (1999). Patterns and modes of b-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 5(Suppl 1):S15–S18.
- ⁴ Strateva T, Yordanov D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1133–1148.
- ⁵ Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, p.582–610.
- ⁶ Pier GB, Ramphal R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa*, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (Eds): *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6.th ed, p.2587-2615, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
- ⁷ Xavier DE, Picao RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology*, 10:217.
- ⁸ Pitt TL. (1998). *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and related genera, p.1109-1138. *In* Duerden BI (Ed), *Microbiology and microbial infections*, vol. 2. Oxford University Press Inc, New York, NY.
- ⁹ Gessard C. (1984). Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. *Rev Infect Dis*, 6(Suppl 3):S775-S776.
- ¹⁰ Villavicencio RT. (1998). The history of blue pus. *J Am Coll Surg*, 187: 212-216.

-
- ¹¹ Aydın F. (2001). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobiyallere Duyarlılıklarının Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Ankara.
- ¹² Erdem B. (1999). *Pseudomonaslar*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Ustaçelebi Ş. (Ed), Güneş Kitabevi, Ankara, s.551-558.
- ¹³ Freeman L. (1916). Chronic general infection with the *Bacillus pyocyaneus*. *Ann Surg*, 64:195-202.
- ¹⁴ Forkner CE. (1960). *Pseudomonas aeruginosa* infections, Modern medical monographs:22, Grune&Stratton, New York.
- ¹⁵ Stephen H, Gillespie, Peter M. Hawkey. (2006). Principles and Practice of clinical bacteriology second edition, John Wiley-Sons, ltd; p.427-435.
- ¹⁶ Soussy C, Wolfson JS, Ng EY, Hooper C. (1993). Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. *Antimicrob Agents Chemother*, 37:2588-2592.
- ¹⁷ Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WJ. (Eds), (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.316-323.
- ¹⁸ Gowan JRW, Deretic V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*; 60:539-574.
- ¹⁹ Wilson W, Sande M. (2004). Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, İstanbul, s.567-578
- ²⁰ Bilgehan H. (1995). Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji Barış Kitabevi, İzmir, s.161-178.
- ²¹ Erdem B. (1999). *Pseudomonaslar*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Ustaçelebi Ş. (Ed), Güneş Kitabevi, Ankara, s.551-558.

-
- ²² Bergagne E. (2004). *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW. (Eds). *Infectious Diseases*. 2nd ed, Toronto, p.1733-1748.
- ²³ Vahaboğlu H, Akhan S. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (Eds), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, s.2175-2186.
- ²⁴ Akova M. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları. *Flora*, 1:61-65.
- ²⁵ Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. (2002). Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*, 50:11–18.
- ²⁶ Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. (2004). Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2344-2345.
- ²⁷ Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. (1995). Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 35:281-294.
- ²⁸ Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouvelekis LS. (2001). An integron associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother*, 48:627-630.
- ²⁹ Nordmann P, Nass T. (1994). Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 38:104-114.

-
- ³⁰ Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. (2009). Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:2225-2226.
- ³¹ Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM. (2001). VEB-1-like extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis*, 17:468-470.
- ³² Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:2385-2392.
- ³³ Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas MDM, Faris C, Vardhan MS, Dawson, Cotterill SL, Livermore DM. (2008). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*, 62:1265-1268.
- ³⁴ Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:147-151.
- ³⁵ Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. (2005). Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*, 41(Suppl 4):S276-S278.
- ³⁶ Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, Yong D, Chong Y. (2004). Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 50:51-58.

-
- ³⁷ Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. (2009). Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:1660-1664.
- ³⁸ Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GiM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4654-4661.
- ³⁹ Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 52:699-702.
- ⁴⁰ Livermore DM, Woodford N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*, 3:489-495.
- ⁴¹ Nordmann P, Poirel L. (2002). Emerging carbapenemases in gramnegative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, 8:321-331.
- ⁴² Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones ME, Walsh TR. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother*, 50:673-679.
- ⁴³ Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:1553-1555.
- ⁴⁴ Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM. (2009). First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol(Paris)*, 57(6):493-495.

-
- ⁴⁵ Naas T, Nordmann P. (1999). OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*, 5:865–879.
- ⁴⁶ Doi, Y. & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanisms against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 45, 88–94.
- ⁴⁷ Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H. & Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362, 1888–1893.
- ⁴⁸ Doi Y, Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson D. (2007). Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:852-856.
- ⁴⁹ Galimand M, Courvalin P, Lambert T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:2565-2571.
- ⁵⁰ Galimand M, Sabtcheva P, Courvalin P, Lambert T. (2005). Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene borne by composite transposon *Tn1548*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:2949-2953.
- ⁵¹ Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura N, Ike Y, Arakawa Y. (2006). Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:178-184.
- ⁵² Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. (2005). Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis*, 11:951-953.

-
- ⁵³ Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 362:1888-1893.
- ⁵⁴ Poole K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:479-487.
- ⁵⁵ Girlich D, Naas T, Nordmann P. (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2043-2048.
- ⁵⁶ Hooper DC. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, 31:24-28.
- ⁵⁷ Akasaka JR, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2263-2268.
- ⁵⁸ Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 25:290-295.
- ⁵⁹ Mouneimne H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:62-66.
- ⁶⁰ Hancock RE, Brinkman FS. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*, 56:17-38.
- ⁶¹ Nikaido H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 33:1831-1836.

-
- ⁶² Yoshimura F, Nikaido H. (1985). Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 27:84-92.
- ⁶³ Trias J, Nikaido H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34:52–57.
- ⁶⁴ Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. (2002). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 4:872-882.
- ⁶⁵ Poole K, Srikumar R. (2001). Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms, and clinical significance. *Curr Top Med Chem*, 1:59-71.
- ⁶⁶ Schweizer HP. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*, 2:48-62.
- ⁶⁷ Piddock LJ. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4:629-636.
- ⁶⁸ De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:1761-1770.
- ⁶⁹ Poole K, Heinrichs DE, Neshat S. (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol*, 10:529-544.
- ⁷⁰ Li XZ, Nikaido H, Poole K. (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39:1948-1953.

-
- ⁷¹ Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. (1999). Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB- OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:400-402.
- ⁷² Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T, Tsuchiya T. (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol*, 47:27-32.
- ⁷³ Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. (1996). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 40:2021-2028.
- ⁷⁴ Evans K, Adewoye L, Poole K. (2001). MexR repressor of the *mexAB- oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J Bacteriol*, 183:807-812.
- ⁷⁵ Saito K, Eda S, Maseda H, Nakae T. (2001). Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 195:23-28.
- ⁷⁶ Sobel ML, Hocquet D, Cao L, Plesiat P, Poole K. (2005). Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multi-drug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:1782-1786.
- ⁷⁷ Morita Y, Cao L, Gould VC, Avison MB, Poole K. (2006). *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 188:8649-8654.

-
- ⁷⁸ Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li XZ, Nishino T. (1996). Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 21:713-724.
- ⁷⁹ Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. (2002). Efflux-mediated resistance among *Pseudomonas aeruginosa*: complex regulation of a complex resistance mechanism, abstr. A-132. Abstr. 102nd Gen Meet Am Soc Microbiol, Salt Lake City, UT.
- ⁸⁰ Morita Y, Komori Y, Mima T, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. (2001). Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol Lett*, 202:139-143.
- ⁸¹ Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henz U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 23:345-354.
- ⁸² Li XZ, Barre N, Poole K. (2000). Influence of MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 46:885-893.
- ⁸³ Kohler T, Epp SF, Curty LK, Pechere JC. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 181:6300-6305.

-
- ⁸⁴ 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*, 43:1085-1090.
- ⁸⁵ Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T. (2000). Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 192: 107-112.
- ⁸⁶ Sobel ML, Neshat S, Poole K. (2005). Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187:1246-1253.
- ⁸⁷ Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 105:18947-18952.
- ⁸⁸ Westfall LW, Carty NL, Layland N, Kuan P, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. (2006). *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett*, 255:247-254.
- ⁸⁹ Mine T, Morita Y, Kataoka T, Mizushima T, Tsuchiya T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:415-417.
- ⁹⁰ Chuanchuen R, Murata T, Gotoh N, Schweizer HP. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM and OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:2133-2136.

-
- ⁹¹ Murata T, Gotoh N, Nishino T. (2002). Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol Lett*, 217:57-63.
- ⁹² Poole K. (2002). Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*, 3:77-98.
- ⁹³ Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2242-2246.
- ⁹⁴ Matsuo Y, Eda S, Gotoh N, Yoshihara E, Nakae T. (2004). MexZ- mediated regulation of *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 238:23-28.
- ⁹⁵ Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol*, 184:5036-5044.
- ⁹⁶ Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*, 148:2371-2381.
- ⁹⁷ Palma M, Zurita J, Ferraras JA, Worgall S, Larone DH, Shi L, Campagne F, Quadri LE. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun*, 73:2958-2966.
- ⁹⁸ Aendekerk S, Diggle SP, Song Z, Hoiby N, Cornelis P, Williams P, Camara M. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic

susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*, 151: 1113-1125.

⁹⁹ Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 52:572-575.

¹⁰⁰ Mima T, Sekiya H, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pump, MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 49:999-1002.

¹⁰¹ Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP. (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J Bacteriol*, 189:7600-7609.

¹⁰² Colom K, Fdz-Aranguiz A, Suinaga E, Cisterna R. (1995). Emergence of resistance to beta-lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa* with group 1 beta-lactamases in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14:964-971.

¹⁰³ Sanders CC, Sanders WE. (1986). Type I beta-lactamases of gram negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis*, 154:792-800.

¹⁰⁴ Labia R, Morand A, Peduzzi J. (1986). Timentin and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 17(Suppl. C):S17-S26.

¹⁰⁵ Lindberg F, Lindquist S, Normark S. (1988). Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I beta-lactamase in nonfastidious gram-negative bacilli. *Rev Infect Dis*, 10:782-785.

-
- ¹⁰⁶ Langae TY, Dargis M, Huletsky A. (1998). An *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:3296-3300.
- ¹⁰⁷ Langae TY, Gagnon L, Huletsky A. (2000). Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyper-inducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:583-589.
- ¹⁰⁸ Lodge JM, Busby SJW, Piddock LJ. (1993). Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa ampR* gene and its role at the chromosomal *ampC* beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol Lett.* 111:315-320.
- ¹⁰⁹ Lodge JM, Minchin SD, Piddock LJ, Busby SJW. (1990). Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal *ampC* beta-lactamase. *Biochem J.* 272:627-631.
- ¹¹⁰ Lindberg F, Westman L, Normark S. (1985). Regulatory components in *Citrobacter freundii ampC* beta-lactamase induction. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 82:4620-4624.
- ¹¹¹ Moya B, Dotsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A. (2009). Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 5(3):e1000353.
- ¹¹² Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. (1996). Location of N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamylmesodiaminopimelic acid, presumed signal molecule for beta-lactamase induction, in the bacterial cell. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:2173-2177.
- ¹¹³ Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. (1997). The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:2113-2120.

¹¹⁴ Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT. (1994). Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J*, 13:4684-4694.

¹¹⁵ Oliva B, Bennett PM, Chopra I. (1989). Penicillin-binding protein 2 is required for induction of the *Citrobacter freundii* class I chromosomal beta-lactamase in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 33:1116-1117.

¹¹⁶ Hanson ND, Sanders CC. (1999). Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des*, 5:881-894.

¹¹⁷ Jacobs C, Frere JM, Normark S. (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell*, 88:823-832.

¹¹⁸ Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997–1999. *Clin Infect Dis*, 32(suppl 2):S146–S155.

¹¹⁹ CLSI. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

¹²⁰ Yücesoy Dede B. (2006). Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyalere duyarlılıkları. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul.

-
- ¹²¹ Kolayli F, Karadenizli A, Savli H, Ergen K, Hatirnaz O, Balikci E, Budak F, Vahaboglu H. (2004). Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the oprD, oprM and oprN genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 53 (pt 9): 915-920.
- ¹²² LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I. (2011). Version 18. www.roche-applied-science.com.
- ¹²³ Souza F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21(2): 280–285.
- ¹²⁴ Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29, 9, e45.
- ¹²⁵ Bustin SA. (2002). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29(1): 23–39.
- ¹²⁶ Fraga D, Meulia T, Fenster S. (2008). Real-Time PCR. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, Gallagher, S. R., & Wiley, E. A. (Eds), 10.3.1–10.3.34, John Wiley and Sons, Inc. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et1003s00/full>
- ¹²⁷ Peirson SN, Butler JN, Foster RG. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 31(14): e73.
- ¹²⁸ Livak KJ. (2001). Relative quantification of gene expression, ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2;. <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>
- ¹²⁹ Pfaffl MW. (2004). Quantification strategies in real-time PCR, In: *A-Z of quantitative PCR*, Bustin, S.A., pp. 87–112, International University Line, 0963681788, CA, USA.

-
- ¹³⁰ Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.*, 6, 4, 279-284.
- ¹³¹ Valasek MA, Repa JJ. (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.*, 29, 3, 151-159.
- ¹³² Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. (2005). Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 342(1): 69–77.
- ¹³³ Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C(T)$ Method. *Methods* 25(4): 402–408.
- ¹³⁴ Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3, 7, 0034.1-003411.
- ¹³⁵ Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6): 509–515.
- ¹³⁶ Pfaffl MW. (2006). Relative quantification, In: *Real-time PCR*, Dorak T. M., pp. 63-87, International University Line, 0-4153-7734-X, New York, USA.
- ¹³⁷ Livak KJ. (1997 & 2001). *ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2 Relative quantification of gene expression*. ABI company publication.
- ¹³⁸ LightCycler Relative Quantification Software. (2001). Version 1.0, Roche Molecular Biochemicals.

-
- ¹³⁹ Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. (2006). Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamalar. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. (Eds), Palme yayıncılık, Ankara.
- ¹⁴⁰ Durmaz R, Ayan M. (2001). *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Molekuler Epidemiyolojisinde ‘Arbitrarily Primed’ PZR ve ‘Pulsed-Field Gel’ Elektrofrezisi. İçinde:Uygulamalı Molekül Mikrobiyoloji. R Durmaz (Ed), s.219-228.
- ¹⁴¹ Durmaz R. (2001). Kullanılan Tampon ve Çözeltiler. İçinde:Uygulamalı Molekül Mikrobiyoloji. R. Durmaz (Ed), s.229-235.
- ¹⁴² Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Sua´rez C, Pen˜a C, Martínez-Martínez L, Oliver A, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). (2011). Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. Antimicrob Agents Chemother, p.1906-1911.
- ¹⁴³ Morrison AJ, Wenzel RP. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, 6(Suppl. 3):S627-S642.
- ¹⁴⁴ National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from October 1986 to April 1998, issued June 1998. (1998). Am J Infect Control, 26:522–533.
- ¹⁴⁵ Jones RN, Stilwell MG, Rhomberg PR, Sader HS. (2009). Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2007). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 65(3):331-334.
- ¹⁴⁶ Wang H, Chen M, Ni Y, Liu Y, Sun H, Yu Y, Yu X, Mei Y, Liu M, Sun Z, Chu Y, Hu Z, Huang X. (2010). Antimicrobial resistance among clinical isolates from the Chinese Meropenem Surveillance Study (CMSS) 2003-2008. International Journal of Antimicrobial Agents, 35:227-234.

-
- ¹⁴⁷ Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. (2009). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Ankem Derg*, 23(2):54-58.
- ¹⁴⁸ Dündar D, Sönmez Tamer G. (2009). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. *Ankem Derg*, 23(1):17-21.
- ¹⁴⁹ Güven , nver D, zdemir S, Gönüllü N, Küçükbasmacı , Altaş K. (2008). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38(3-4):112-116.
- ¹⁵⁰ Eyiğr M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. (2009). Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 23(3):101-105.
- ¹⁵¹ Gur D, Hascelik G, Aydın N, Telli M, Gültekin M, Oğln D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gülay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupinar B, Darka O, Akgün Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Berktaş M, Yaman G. (2009). Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *Journal of Chemotherapy*, 21(4):383-389.
- ¹⁵² Kireci E, Sevin İ. (2008). Klinik rneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının eşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, *ANKEM Derg*, 22(4):209-12.
- ¹⁵³ Kalem F, Gndem NS, Feyzioğlu B, Arslan U, Tuncer İ. (2008). eşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*, 22(3):123-6.
- ¹⁵⁴ Kuster SP, Ruef C, Zbinden R et al. (2008). Stratification of cumulative antibiograms in hospitals for hospital unit, specimen type, isolate sequence and duration of hospital stay. *J Antimicrob Chemother*, 62(6):1451-61.

-
- ¹⁵⁵ Gündüz T, Sivrel Arısoy A, Algün Ü, Borand H, Özbakkaloğlu B. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiklere direnci. *İnfeksiyon Derg*, 19(3):353-356.
- ¹⁵⁶ Pechere JC, Köhler T. (1999). Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Microbiol Infect*, 5(Suppl 1):S15-8.
- ¹⁵⁷ McGowan JE. (2006). Resistance in nonfermenting gramnegative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 34, S29–S37.
- ¹⁵⁸ Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. (2004). Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:3086-3092.
- ¹⁵⁹ Sakyo S, Tomita H, Tanimoto K, Fujimoto S, Ike Y. (2006). Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot*, 59:220-228.
- ¹⁶⁰ El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijsers B, Kronvall G, Wretling B. (2005). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*, 113:187-196.
- ¹⁶¹ Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. (2006). Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, p.1633-1641.
- ¹⁶² Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. (2009). Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, p.4783-4788.
- ¹⁶³ Yoneyama H, Nakae T. (1993). Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37:2385-2390.

-
- ¹⁶⁴ Wolter DJ, Acquazzino D, Goering RV, Sammut P, Khalaf N, Hanson ND. (2008). Emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a patient with cystic fibrosis in the absence of carbapenem therapy. *Clin Infect Dis*, 46:137-141.
- ¹⁶⁵ Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 279:8761-8768.
- ¹⁶⁶ Evans JC, Segal H. (2007). A novel insertion sequence, ISPA26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:3776-3777.
- ¹⁶⁷ Perez FJ, Gimeno C, Navarro D, Garcia-de-Lomas J. (1996). Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than OprD porin channel. *Chemotherapy*, 42:210-214.
- ¹⁶⁸ Brown SD, Traczewski MM. (2005). Comparative *in vitro* antimicrobial activity of a new carbapenem, doripenem: tentative disc diffusion criteria and quality control. *J Antimicrob Chemother*, 55:944-949.
- ¹⁶⁹ Livermore D. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*, 47:247-250.
- ¹⁷⁰ Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:1964-1971.
- ¹⁷¹ Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. (2002). Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(4):529-544.
- ¹⁷² Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. (2008). Discordance between imipenem resistance and *oprD* expression in a *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing

mexEF-oprN, abstr. C1-1061. Abstr. 48th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, Washington, DC.

¹⁷³ Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. (2005). AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the *mexCD-oprJ* efflux pump. Antimicrob Agents Chemother, 49:4763-4766.

¹⁷⁴ Giske CG, Buaro L, Sundsfjord A, Wretling B. (2008). Alterations of Porin, Pumps, and Penicillin-Binding Proteins in Carbapenem Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Drug Resistance, 14;1.

¹⁷⁵ Fung-Tomc JC, Gradelski E, Kolek B, Minassian B, Pucci M, Kessler RE, Bonner DP. (1995). Activity of carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas aeruginosa* is not dependent on porin protein D2. Antimicrob Agents Chemother, 39:386-393.

¹⁷⁶ Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob Agents Chemother, 43:424-427.

¹⁷⁷ Evans K, Poole K. (1999). The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. FEMS Microbiol Lett, 173:35-39.

¹⁷⁸ Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. (2004). Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 48:1320-1328.

¹⁷⁹ Sawada I, Maseda H, Nakae T, Uchiyama H, Nomura N. (2004). A quorum-sensing autoinducer enhances the *mexAB-oprM* efflux pump expression without the

MexR-mediated regulation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 48:435-439.

¹⁸⁰ Masuda N, Gotoh N, Ohya S, Nishino T. (1996). Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40:909-913.

¹⁸¹ Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B. (2003). Role of Efflux Pumps and Mutations in Genes for Topoisomerases II and IV in Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Microbial Drug Resistance*, 9:4.

¹⁸² Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, Tsuchiya T. (2003). Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:991-994.

¹⁸³ Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Nishino T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:1284-1286.

¹⁸⁴ Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. (2008). MexT-associated downregulation of *oprD* in *Pseudomonas aeruginosa* involves inhibition of transcription initiation, abstr. C1-1056. Abstr. 48th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, Washington, DC.

¹⁸⁵ Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. (2008). Novel mechanism of *mexEF-oprN* efflux pump overexpression in *Pseudomonas aeruginosa* without coregulation of *oprD* expression, abstr. C1-1058. Abstr. 48th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, Washington, DC.

¹⁸⁶ Livermore DM. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:2046-2048.

¹⁸⁷ Sanders CC, Gates ML, Sanders WE. (1988). Heterogeneity of class I beta-lactamase expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 32:1893–1895.

¹⁸⁸ Rodriquez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. (2009). Extended- spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:1766-1771.

¹⁸⁹ Tam VM, Chang KT, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Garey KW. (2009). Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 63:279–285.





T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ ETİK DEĞERLENDİRME
KOMİSYON BAŞKANLIĞI



TOPLANTI TARİHİ : 02/09/2010
TOPLANTI NO : 2010/09

KARARLAR :

- 9- Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın "Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalarında Aktif Atım Pompaları ve Porin Proteinlerinin Etkisinin Araştırılması" başlıklı çalışması oy birliği ile etik olarak uygun bulunmuştur.

ASLI GİBİDİR

Doç. Dr. Zehra KURÇER
ZKÜ Tıp Fakültesi

Etik Değerlendirme Komisyon Başkanı