T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KARBAPENEM DİRENÇLİ *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARININ DİRENÇ VE VİRÜLANS GENLERİNİN TARANMASI VE PFGE İLE MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİNİN İNCELENMESİ

DR. HAMİYET BÜŞRA GÜNDOĞDU

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. OSMAN BİROL ÖZGÜMÜŞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2023

EK-1

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr Hayyet Rüya Güvoğdu'a ait
"Karbapenem Dirençli Pseudomonas aeruginosa İzolatlarının Direnç ve Virülans Genlerinin Taranması ve PFGE ile Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 02/02/2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Jüri Başkanı Prof. Dr. Zihni Acar YAZICI
RTE Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Prof. Dr. Ayşe ERTÜRK
RTE Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Prof. Dr. Ayşegül GÖPÜR GİGEK
İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
RTE Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Doç. Dr. Kazım SAATÇİ
RTE Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ömer ŞATIROĞLU

Dekan

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
RESİMLER DİZİNİ ..... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
SEMBOLLER/KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. *Pseudomonas aeruginosa* **2**
2.1.1. Sınıflandırılması ve Epidemiyolojisi **2**
2.1.2. Morfolojik Özellikleri **3**
2.1.3. Üremesi ve Biyokimyasal Özellikleri **3**
2.1.4. Patojenite ve Virülans Faktörleri **5**
2.1.4.1. Kirpik (Flagella) **6**
2.1.4.2. Pilus **6**
2.1.4.3. Lipopolisakkarit **6**
2.1.4.4. Aljinat **7**
2.1.4.5. Elastaz **7**
2.1.4.6. Alkali Proteaz **7**
2.1.4.7. Pyosiyanin-Pyoverdin **7**
2.1.4.8. Proteaz IV **8**
2.1.4.9. Fosfolipaz C **8**
2.1.4.10. Ramnolipid **8**
2.1.4.11. Ekzotoksin A **8**
2.1.4.12. Tip 3 Salgı Sistemi **9**
2.1.4.13. Biyofilm Oluşumu **9**
2.1.5. Quorum Sensing ve Patojenite İle İlişkisi **9**
2.1.6. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları **10**
2.1.6.1. Solunum Sistemi Enfeksiyonları **10**
2.1.6.2. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları **10**
2.1.6.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları **11**
2.1.6.4. Göz Enfeksiyonları **11**

2.1.6.5. Kulak Enfeksiyonları 11
2.1.6.6. Bakteriyemi ve Endokardit 11
2.1.6.7. Diğer Enfeksiyonları.....12
2.1.7. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Antibiyotik Direnci ...12
2.1.7.1. İntrensek Antibiyotik Direnci 13
2.1.7.2. Edinilmiş Antibiyotik Direnci 14
2.1.7.2.1. Mutasyona Bağlı Direnç 14
2.1.7.2.2. Direnç Genlerinin Edinimi 14
2.1.7.2.3. Adaptif Antibiyotik Direnci 14
2.2. Karbapenemler.....15
2.3. Karbapenem Direnci 16
2.3.1. β-laktamaz 16
2.3.1.1. A Sınıfı β-Laktamaz 17
2.3.1.2. B Sınıfı β-Laktamaz.....17
2.3.1.3. C Sınıfı β-Laktamaz 18
2.3.1.4. D Sınıfı β-Laktamaz 18
2.4. Karbapenemaz Üretiminin Belirlenmesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri 18
2.4.1. Fenotipik Yöntemler 19
2.4.2. Genotipik Yöntemler.....19
2.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 20
2.4.2.2. Moleküler Epidemiyolojide Kullanılan Teknikler 20
2.4.2.2.1. Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST) 21
2.4.2.2.2. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Kullanılan Besiyerleri 24
3.1.1. Koyun Kanlı Agar (%5) Besiyeri.....24
3.1.2. Eozin-Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri 24
3.1.3. Luria Bertani (LB) Besiyeri 24
3.1.4. Müeller-Hinton Agar (MHA).....24
3.1.5. Biyokimyasal Belirteçler İçin Kullanılan Besiyerleri.....24
3.2.Kullanılan Çözeltiler 25
3.3. Kullanılan İzolatlar, Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi .26
3.4. Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması 26

3.4.1. Suşların Canlandırılması 26
3.4.2. DNA İzolasyonu.....26
3.4.3. Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması 27
3.4.4. Amplifikasyon Koşulları 29
3.4.5. Elektroforez ve Görüntüleme 30
3.5. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) 30
3.6. İstatistiki Veriler 32
4. BULGULAR.....33
4.1.Antibiyogram Sonuçları.....33
4.2. Direnç ve Virülans Genleri Tarama Sonuçları 37
4.3. PFGE Sonuçları.....40
4.4. İstatistik Değerlendirme Sonuçları.....43
5. TARTIŞMA.....46
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 55
7. KAYNAKLAR 56

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemde emeği geçen değerli rahmetli annem Zahide GÜLLÜ ve babam Rıza GÜLLÜ'ye, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Burhan GÜNDOĞDU'ya, hayatıma anlam ve değer katan oğlum Kayra GÜNDOĞDU'ya, sevgili kardeşlerim dert ortağım Zeynep Kübra ÇIRAK ve Almıla GÜLLÜ'ye,

Tıbbi Mikrobiyoloji tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmayı bilgi ve katkılarıyla yöneten danışman hocam Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde katkı ve emeği geçen eski danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK'e danışmanlığımdan ayrıldıktan sonra bile desteğini esirgemediği için,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Zihni Acar YAZICI'ya, Doç. Dr. Kazım ŞAHİN'e ve maddi manevi desteğini her daim hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi İlkay BAHÇECİ'ye,

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum kıdemlilerim Uzm. Dr. Sema KOÇYİĞİT KALCAN, Uzm. Dr. Yunus Emre İBİK, Uzm. Dr. Nuray ARSLAN ve Uzm. Dr. Deniz Zehra ULUSAN GÜNDOĞDU'ya, sevgili asistan arkadaşlarım Dr. Mustafa ÖZCAN, Dr. Ömer Faruk DURAN, Dr. Esra KARACA, Dr. Duygu AKSOY, Dr. Soner YILDIZ, Dr. Yunus Emre ALPDOĞAN, Dr. Said Nuri Sefa SALIK'a, Dr. Abdurrahman ATAK'a, Dr. Nur Betül Yaşar Bölükbaş'a,

Klinik laboratuvarımızda her daim uyum içinde çalıştığımız çok değerli teknisyen arkadaşlarıma ve tüm mesai arkadaşlarıma,

Tez sürecinde deneysel çalışmalarda yardımcı olan Öğr. Gör. Nebahat EJDER'e ve Erva RAKICI'ya teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bu tez çalışması, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TTU-2020-1191 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Hamiyet Büşra GÜNDOĞDU

ÖZET

Giriş ve Amaç: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) özellikle yoğun bakım hastalarında ciddi enfeksiyona neden olabilen Gram negatif nonfermentatif fırsatçı patojendir. Son yıllarda çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* suşlarının artması tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastaların klinik örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında antibiyotik duyarlılıkları, direnç genleri, virülans genleri ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: VITEK-2 otomatize sistemi ile tanımlanan karbapenem dirençli 58 adet *P. aeruginosa* izolatı ile çalışmaya dahil edildi. Antibiyotik direnç genleri ve virülans genleri PCR ile tarandı. Suşlar arasında klonal benzerliğin tespit edilmesi için PFGE yöntemi kullanıldı. Demografik veriler, antibiyotik direnci ve tespit edilen genler arası ilişkiyi araştırmak için Pearson's Ki-kare ve Fisher's uygunluk testleri kullanıldı.

Bulgular: İzolatların antibiyotik duyarlılıkları aşağıdaki gibi bulundu: amikasin %41.8, gentamisin %67.2, tobramisin %48.2, seftazidim %81.03, sefepim %81.03, siprofloksasin % 67.2, levofloksasin %75.8, piperasilin-tazobaktam %91.38. Direnç genlerinden üç izolatta $bla_{\text{VIM,}}$ 28 izolatta *mexY* tespit edildi. Virülans gemlerinden *exoY* %65.5, *exoT* %56.8, *algD* %44.8, *exoA* %15.5 şeklinde bulundu. Quorum sensing genleri bulunmadı. İstatistiksel olarak *exoT* ile TZP arasında (p=0.012) ve *exoY* yokluğu ile GEN direnci arasında (p=0.037) anlamlı ilişki tespit edildi. PFGE'de baskın salgın izolatı saptanmadı. Kırk bir farklı genotip tespit edilmiş olup izolatlar 12 farklı küme içerisinde toplandı. Kümeleşme oranı ise %47 olarak tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç: Bu çalışmada izolatlarda yüksek düzeyde antibiyotik direncine rastlandı. Kulak akıntı kültürü izolatlarının yüksek dirençli olması dikkat çekti. Direnç geni oranı ülkemizdeki çalışmalarla uyumlu olup diğer ülkelere göre düşük oranda görüldü. Bu çalışmada bulunan virülans genlerinin ülkemiz ve dünya geneli sonuçlara göre düşük oranda olduğu görüldü. PFGE analizi sonucuna göre izolatların çoğunun ilişkisiz olduğu görüldü. Karbapenem dirençli bakterilerin hastalar ve klinikler arası bulaşını kontrol etmek, enfeksiyonların kaynağını tespit etmek ve önleyici stratejiler geliştirmek için moleküler epidemiyolojik çalışmaların ulusal ve uluslararası sahalarda arttırılması gerekir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenem direnci, virülans geni, PFGE

ABSTRACT

Introduction and Purpose: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative, non-fermentative, opportunistic pathogen that can cause serious infections, especially in patients in intensive care. In recent years, the increase in multi-drug resistant *P. aeruginosa* strains has complicated treatment. This study aimed to investigate the antibiotic resistance, virulence genes and clonal relationship among carbapenem-resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* that were obtained from patients admitted to Recep Tayyip Erdogan University Training and Research Hospital.

Materials & Methods: Fifty-eight carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates identified by the VITEK-2 automated system were included in the study. Antibiotic resistance genes and virulence genes were screened by PCR. PFGE method was used to determine the clonal similarity between the strains. Pearson's Chi-square and Fisher's compatibility tests were used to investigate the relationship between demographic data, antibiotic resistance and detected genes.

Results: The antibiotic susceptibility of the isolates was as follows: amikacin 41.8%, gentamicin 67.2%, tobramycin 48.2%, ceftazidime 81.03%, cefepime 81.03%, ciprofloxacin 67.2%, levofloxacin 75.8%, and piperacillin-tazobactam 91.38%. Of the resistance genes, bla_{VIM} was detected in three isolates, and *mexY* was detected in 28 isolates. Among the virulence genes, *exoY* was found in 65.5% of isolates, exoT in 56.8%, algD in 44.8%, and exoA in 15.5%. Quorum-sensing genes were not found. A statistically significant correlation was found between exoT and PRP ($p=0.012$) and also between the absence of *exoY* and gentamicin resistance ($p=0.037$). No dominant epidemic strain was detected in PFGE. Forty-one different genotypes were found(observed), and the isolates were collected into 12 different clusters. The clustering rate was found to be 47%.

Discussion & Conclusions: In this study, high levels of antibiotic resistance were found in isolates. High resistance of ear drainage culture isolates was noted. The resistance is low compared to other country's gene rates however it is compatible with the studies in our country. The virulence gene rates were found lower than studies conducted in our country and the world. According to the results of the PFGE analysis, most of the isolates were unrelated. No significant relationship was found between isolates whose band profiles were the same or closely related and demographic data. In order to control the transmission of carbapenem-resistant bacteria between patients and wards, molecular epidemiological

studies should be expanded at national and international levels to identify the source of infections and to develop preventive strategies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem resistance, virulence gene, PFGE

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* virülans mekanizmaları.....6

Şekil 2. *Pseudomonas aeruginosa*'da intrensek antibiyotik direnci mekanizmalarının şematik gösterimi.....13

Şekil 3. A. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlerin β-laktam halkaları B. Karbapenem antibiyotiklerinin önemli yapısal özellikleri. 15

Şekil 4. Beta-laktamazların moleküler sınıflandırılması 17

Şekil 5. CHEF şematik gösterimi. 23

Şekil 6. A. Örneklerin geldiği klinik B. Örnek Türü 33

Şekil 7. PFGE dendogram görüntüleri.....41

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Koyun kanlı agarda beta hemoliz, R koloni ve metalik görünüm. 5

Resim 2. Laboratuvarda bulunan CHEF-DR II sistemi.....32

Resim 3. ***e****xoY, mexy, exoA, exoT,* bla_{VIM}*, algD* genlerinin agaroz jel ile görüntülenmesi .40

Resim 4. PFGE jel band görüntüleri.....41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *Pseudomonas*'ların sınıflandırılması 2

Tablo 2. Karbapenemaz üretiminin tanı yöntemleri 19

Tablo 3. PCR karışımındaki reaktifler ve miktarları. 27

Tablo 4. Antibiyotik direnç genlerinin ve virülans genlerinin PCR ile araştırılmasında kullanılan primer dizileri, amplikon büyüklükleri ve primer bağlanma sıcaklıkları. 28

Tablo 5. PCR deneylerinde kullanılan döngü parametrileri. 29

Tablo 6. İzolatlara ait antibiyogram sonuçları, örnekleri gönderen klinik ve örnek türü bilgileri. 34

Tablo 7. İzolatların antibiyotik duyarlılık yüzde sonuçları. 37

Tablo 8. İzolatlarda PCR ile belirlenen direnç ve virülans genleri. 38

Tablo 9. Direnç ve virülans genlerinin kategorilendirilmiş örnek türleriyle istatistiki ilişkisi. 43

Tablo 10. *exoY* geniyle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu. ...44

Tablo 11. *exoT* geniyle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu. ...45

SEMBOLLER/KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ATCC: American Type Culture Collection

bp: base pare, baz çifti

CHEF: Clamped Homogeneous Electric Field

CIM: Karbapenem inaktivasyon metodu

COVID-19: Koronavirüs Hastalığı 2019

CP-CRPA: Carbapenemase procuding carbapenem resistant *P. aeruginosa*

CPO: Carbapenemase Producing Organizms , Karbapenemaz üreten organizma

CRAB: Carbapenem resistance *Acinetobacter baumannii complex,* Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii complex*

CRE: Carbapenem resistance *Enterobacterales*, Karbapenem dirençli *Enterobacterales*

CRPA: Carbapenem resistance *P. aeruginosa* , Karbapenem dirençli *P. aeruginosa*

CRPA: Carbapenem Resistance *P. aeruginosa,* Karbapenem Dirençli *P. aeruginosa*

E.coli: Escherichia coli

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EMB: Eozin-Metilen Blue

ESBL: Extended spektrum β-laktamaz , Geniş spektrumlu β-laktamaz

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi

Exo A: Ekzoenzim A

Exo S: Ekzoenzim S

Exo T: Ekzoenzim T

Exo U: Ekzoenzim U

Exo Y: Ekzoenzim Y

FIGE: Field Inversion Gel Electrophoresis

HLS-1: Hücre lizis solüsyonu-1

HLS-2: Hücre lizis solüsyonu-2

HST: Hücre Süspansiyon Tamponu

IMP: İmipenemase

IPM: İmipenem

MEM: Meropenem

AK: Amikasin

GEN: Gentamisin

TOB: Tobramisin

CAZ: Seftazidim

FEP: Sefepim

CIP: Siprofloksasin

LEV: Levofloksasin

TZP: Piperasillin/tazobaktam

COL: Kolitsin

KF: Kistik Fibrozis

KPC: *Klebsiella Pneumonia* carbapenemase

LB: Luria-Bertani

MALDITOF-MS: Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry, Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon

MDR: Multidrug resistant, Çoklu ilaç direnci

MHA: Müeller Hinton Agar

MHT: Modifiye Hodge Testi

MİK: Minimum inhibitor konsantrasyon

MLST: Multilocus sequence typing, Çoklu bölge sekans tiplendirme

MSS: Merkezi sinir sistemi

OFAGE: Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis

OXA: Oksasilinaz

PBP: Penisilin bağlayan proteinler

PCR: Polymerase chain reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu

PDR: Pandrug resistant

PFGE: Pulsed field gel electrophoresis, Darbeli alan jel elektroforezi

plcH : Hemolitik fosfolipaz C geni

plcN : Hemolitik olmayan fosfolipaz C geni

QS : Quorum sensing , çoğunluğu algılama

RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic PCR

Rep-PCR: Repetitive sequence based PCR

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RGE: Rotating Gel Electrophoresis

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

T3SS: Tip 3 salgı sistemi

TAE: Tris Asetik Asit Etilendiamintetraasetik asit

TAFE: Transverse Alternating Field Electrophoresis

TBE: Tris Borik Asit Etilendiamintetraasetik asit

TE: Tris EDTA

Tm: Primer bağlanma sıcaklığı

VIM: Verona Integron-Encoded Metallo-beta-lactamase

VNTRs: Variable number tandem repeats, Değişken sayıda tandem tekrarı

WGS: Whole genome sequencing, Tüm genom sekanslama

WHO: World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü

XDR: Extensively drug resistant , Yaygın ilaç direnci

β-laktam: Beta laktam

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) *Pseudomonadaceae* ailesine ait özellikle yoğun bakım hastalarında ciddi enfeksiyona neden olabilen Gram negatif nonfermentatif fırsatçı patojendir. Nadiren sağlıklı bireyleri enfekte eder, özellikle kistik fibrosiz (KF) hastalarında ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan enfeksiyonlara neden olur[1,2]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın hastalık oluşturabilme kapasitesi yapısal bileşenleri, toksinleri ve enzimleri gibi virülans faktörleri tarafından belirlenir[3].

Son yıllarda çoklu ilaç dirençli (MDR, Multidrug resistant) *P. aeruginosa* suşlarının artması uygun antibiyotik seçimi zorlaşmıştır[4]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın sahip olduğu intrensek direnç ve florokinolonlar, β laktamlar ve aminoglikozitler gibi birçok antibiyotik grubuna direnç oluşturabilme kapasitesi ciddi bir endişe haline gelmiştir[5]. Birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi klinisyenleri karbapenem grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımına yönlendirmiş ve bu durum da karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hızla artışına neden olmuştur[6].

Pseudomonas aeruginosa'da karbapenem direnci başlıca porin kaybı, efflux pompalarının aktivite artışı ve intrinsik beta laktamazların (β-laktamaz) ekspresyonu gibi kromozomal aracılı mekanizmalardan kaynaklanmaktadır[7]. Bunun yanında plazmid aracılı olarak hızla diğer bakterilere aktarılan ve karbapenemazları kodlayarak tüm dünyada antibiyotik direncine yol açan direnç genleri ortaya konmuştur[8]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans ve direcindeki endişe verici artış bu enfeksiyonun başarılı olarak tedavi edilebilmesi için dirençli patojenlerin yakından takip edilmesini gerekli kılmaktadır[9].

Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi, direnç ve virülans genlerinin taranması; tespit edilen genlerle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin aranması ve en son Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi ile izolatlar arasında arası klonal ilişkisinin epidemiyolojik verilerle birlikte analiz edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Sınıflandırılması ve Epidemiyolojisi

Pseudomonas aeruginosa Pseudomonadaceae ailesinde *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Pseudomonas* cinsi bakteriler rRNA – DNA homoloji çalışmalarına göre beş homolog rRNA grubuna ayrılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* Grup I'in alt grubu olan Fluoresan Grubunun prototip üyesidir[10]. *Pseudomonas'*ların sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. *Pseudomonas'*ların sınıflandırılması[11].

rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu		**Cins ve Tür**
I	Fluoresan Grubu	*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*
	Nonfluoresan Grubu	*Pseudomonas stutzeri* *Pseudomonas mendocina*
II		*Burkholderia pseudomallei* *Burkholderia mallei* *Burkholderia cepacia* *Ralstonia pickettii*
III		*Comamonas* türleri *Acidovorax* türleri
IV		*Brevundimonas* türleri
V		*Stenotrophomonas maltophilia*

Pseudomonas cinsi bakterilerin birçoğu doğada, toprakta, çürüyen organik maddelerde, sularda bulunmaktadır. Hastanede yatan hastalar, entübe hastalar ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar dışında insanlarda normal flora elemanı olarak kolonizasyonu beklenmemektedir. *Pseudomonas* cinsi bakteriler nemli bölgelerde, dezefektanlarda üremeye meyilli olup su kaynaklı salgınlara neden olmaktadırlar. Besin maddelerini kullanma açısından uyum gösterme becerisi ve basit çözeltilerde rahat üreyebilmesi nedeniyle hastanede yatan hastaların anestezi cihazlarını, intravenöz sıvılarını ve ayrıca distile suları kontamine edebilmektedirler[10,12,13]. *Pseudomonas'*ın, özellikle *P. aeruginosa* dışındaki türlerin klinik bir örnekten izolasyonu hastada geçici kolonizasyonu veya kontaminasyonu düşündürmektedir[12].

Pseudomonas aeruginosa cerrahi yaralarda mavi yeşil renk değişikliği yapan mikroorganizma olarak 1850 yılında Sedillot tarafından tanımlanmıştır. Renk değişikliğinden sorumlu olan piyosiyanin pigmenti 1860 yılında Fordos tarafından ekstrakte edilmiştir. İlk olarak *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırılan bu çubuk şeklindeki mikroorganizma piyosiyanin üretimi ile ilk olarak 1862 yılında Lucke tarafından ilişkilendirilmiştir. Daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılan bu mikroorganizma 1882 yılında Gessard tarafından saf kültür olarak izole edilmiştir. İlk olarak 1897 yılında Hitschman ve Kreibich tarafından, 1917 yılında Frenkel ve 1925 yılında Osler tarafından *P. aeruginosa'nın* patojen bir bakteri olduğu belirtilmiştir[14,15].

2.1.2. Morfolojik Özellikleri

Pseudomonas hareketli düz veya hafif kavisli, genelde çiftler halinde bulunan gram negatif çubuk şeklinde mikroorganizmadır. Bir ya da iki tane polar flagellası bulunup; 0,5-0,8 μm enine, 1,5-3 μm boyuna sahiptir. Spor oluşturmamaktadır. Kapsüllü suşları bulunmakta olup özellikle KF'li hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Zorunlu aerop olarak bahsedilse de elektron alıcısı olarak arginin ve nitratı kullanarak anaerobik olarak da üreyebilmektedirler[12,16].

2.1.3. Üremesi ve Biyokimyasal Özellikleri

Sitokrom oksidaz varlığı ve nonferment olmasıyla *Enterobacterales* ailesinden ayrılmaktadır. *Pseudomonas*'ın en uygun şartlarda üremesi için ortam 30-37ºC ve hafif alkali olmalıdır. 42ºC'de de üreyebilme yeteneği *P. aeruginosa*'yı flouresan grubundaki diğer türlerinden ayırmaktadır[16,17]. Koyun kanlı agarda çevreye yayılan geniş gri koloniler ve beta hemoliz yaparak üremektedir. Kolonileri tipik timsah derisine benzer metalik

parlak görünümündedir (Resim 1). *S*mooth (s), mucoid (m) ve rough (r) koloni yapabilmektedir. M tipi koloni yapan suşlar pigment oluşturmazlar[10,17].

Nonferment olan mikroorganizma eosin methylene blue (EMB), MacConcey ve endo agar gibi besiyerlerinde laktoz negatif şeffaf koloni yapmaktadır[16]. Kültürde *P. aeruginosa*'ya özgü tatlımsı aromatik bir koku oluşur, nadiren "çürük patates" kokusu üreten suşlar da mevcuttur[10].

Pseudomonas aeruginosa alkali pH'da mavi veya yeşilimsi renk oluşturan piyosiyanin ve pyoverdin pigmenti üretmektedir. Pyoverdin floresan pigment olup besiyerinde sarı yeşil renk değişimine neden olur. Pyosiyanin floresan gruptaki mikroorganizmalardan sadece *P. aeruginosa* tarafından üretilen non floresan pigmenttir ve besiyerinde mavi renk değişimine neden olmaktadır[11,12,17]. *Pseudomonas*'ın bazı suşları piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) gibi pigmentler de üretmektedir[16].

Pseudomonas aeruginosa'nın diğer biyokimyasal özellikleri şu şekilde sıralanabilmektedir.

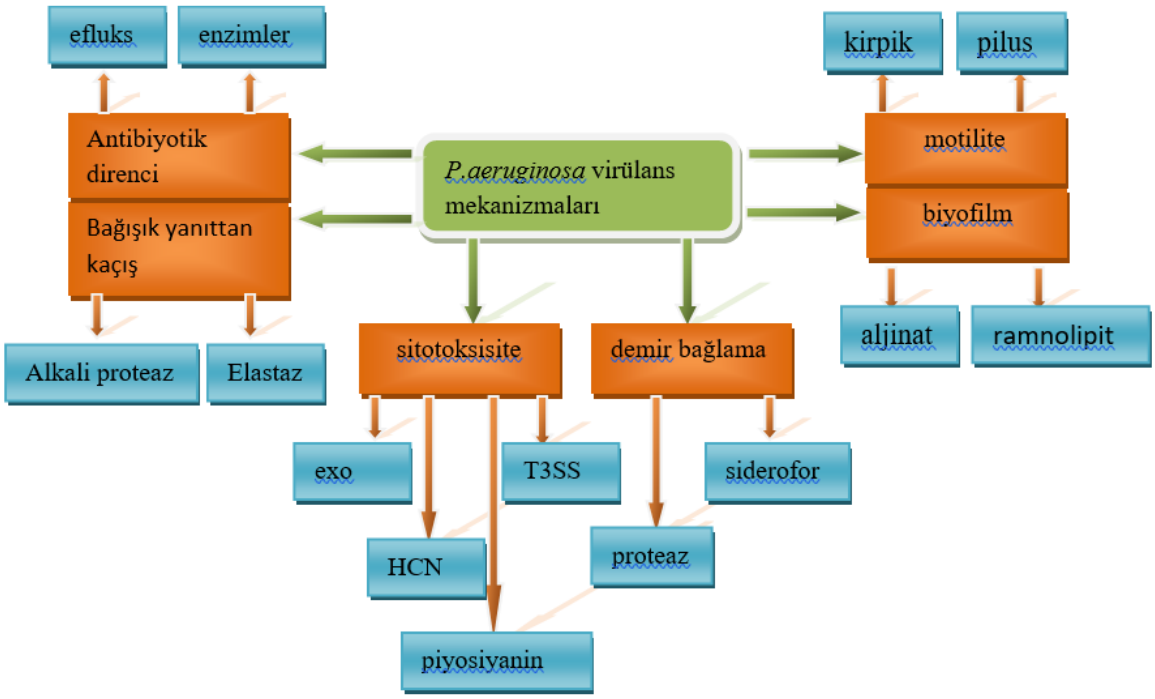
- Sitrat ve katalaz tepkimeleri pozitiftir.
- İndol ve hidrojen sülfür negatiftir.
- Nitratı nitrite çevirebilmektedir.
- L-arjinin dihidrolaz pozitif olup; L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir.
- Voges-Proskauer ve Metil Red testi negatifir.
- Potasyum siyanüre dayanıklıdır.
- Koagüle plazmayı ve jelatini eriterek parçalamaktadır; bu işlemde de ortamda mavi-yeşil renk oluşturmaktadır[10,11,12,17].



Resim 1. Koyun kanlı agarda beta hemoliz, R koloni ve metalik görünüm (orijinal).

2.1.4. Patojenite ve Virülans Faktörleri

Birçok yerde bulunan birçok ortamda rahat üreyen *P. aeruginosa* insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojendir[10,18]. Neden olduğu enfeksiyonlar kolonizasyon, invazyon ve sistematik yayılım olacak şekilde üç aşamada meydana gelmektedir[10]. Bu enfeksiyonlar konakçının immun sisteminin zayıflamasını fırsat bilen bakteriye ait çok çeşitli virulans faktörlerinin de katkısıyla mikroorganizmanın dokuya bağlanması ve kolonizasyonu ile başlamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenik bakterilerin virülans faktörlerini kodlayan genomik adalar, patojenite adaları adını almaktadır. Bu virülans faktörlerinin çoğu, patojenite (PAPI) veya genomik (PAGI) adalarının bir parçası olarak aksesuar genomda yer almaktadır[19,20,21].



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* virülans mekanizmaları[16].

2.1.4.1. Kirpik (Flagella)

Pseudomonas aeruginosa konak dokuya tutunabilmek (adezyon) ve yayılabilmek için flagella ile hareket etmektedir. Flagella bakterinin yüzme şeklindeki hareketinden sorumludur. Flagella güçlü immunojen olduğundan dolayı, kronik enfeksiyonlarında konak bağışık yanıtından kaçabilmek için flagellasız mutantlar seçilmektedir[10,22,23].

2.1.4.2. Pilus

Pseudomonas aeruginosa'nın kısa filamentöz seğirme (twitching) şeklinde hareketinden sorumlu yüzey yapısıdır. Bakterinin en önemli adezyon faktörünü oluşturmaktadır[12,20].

Flagella ve pilus kolonizasyonun adezyon aşamasında etkili olarak patogenezde kritik önem taşımaktadır[20].

2.1.4.3. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit *P. aeruginosa*'nın adezyonundan sorumlu önemli bir başka virülans faktörüdür. Üç yapıdan oluşmaktadır: Lipid A, kor polisakkarit ve O-özgül polisakkarit. Lipit A yapısı tüm gram negatiflerde olduğu gibi endotoksik özellik gösterir.

Aynı zamanda KF'li hastaların akciğerlerinde doku hasarına neden olmaktadır. Kor polisakkariti bakteriyel canlılık için önemlidir. O-özgül polisakkarit zincirleri serotiplendirmede önemli olup bakteriyi fagositoza karşı korumaktadır[24].

2.1.4.4. Aljinat

Aljinat glukuronik asit ve mannuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden oluşan mukoid ekzopolisakkarittir. Hücre dışına salınan ekzopolisakkarit olmasına rağmen hücre ile ilişkili kalması nedeniyle hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında yer almaktadır ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu akciğer enfeksiyonlarında önemli bir yere sahiptir. *Pseudomonas aeruginosa* KF hastalarının akciğerinde genellikle aljinatın aşırı üretimiyle karakterize mukoid fenotipe geçiş yapmaktadır[22,25,26].

Aljinat da bakteri adezyonunda rol oynayan virülans faktörlerindendir. Aynı zamanda aljinatın aşırı üretimi bakteriyi fagositozdan, antibiyotiklerden korumakta ve konağın bakteriye yanıtını zayıflatmaktadır[22].

2.1.4.5. Elastaz

Elastin, insan akciğerinde majör proteindir ve elastazda bu proteini parçalamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın yaptığı enfeksiyonlarda elastaz konağın doğal bariyer bütünlüğünü bozup dokuya invazyonunu sağlamaktadır. *Pseudomonas'*ın neden olduğu doku hasarından kollajen yıkımı sorumludur. Elastaz tip-3 ve tip-4 kollajeni yıkmaktadır[27,28]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın elastolitik fonksiyonundan LasA proteaz ve LasB elastaz enzimleri sorumludur. LasA serin metalloproteinaz olup elastolitik etkisi yoktur ancak çinko metalloproteaz olan LasB elastazın elastolitik aktivitesine sinerjistik etki göstermektedir. Bu iki enzim sırasıyla *lasA* ve *lasB* geni tarafından kodlanmaktadır[29,30,31].

2.1.4.6. Alkali Proteaz

Pseudomonas aeruginosa kökenlerinin büyük kısmında proteaz üretiminin olduğu tespit edilmiştir. Fibrinoliz etkisinden sorumlu enzimdir. Elastaza benzer şekilde doku yıkımında ve invazyonuna katkıda bulunmaktadır[10,12].

2.1.4.7. Pyosiyanin-Pyoverdin

Pyosiyanin oksijenin toksik formlarının üretimini katalize ederek, α-1 proteaz inhibitörünü etkisizleştirip, proteaz-antiproteaz dengesini bozarak doku hasarına yol

açmaktadır. Oksitlenmiş glutatyon seviyesini yükselterek nötrofil apopitozunu indüklemekle beraber interlökin-8 seviyesini de yükselterek nötrofil göçünü arttırıp konak bağışıklık yanıtını etkilemektedir[12,32,33]. Piyosiyanin aynı zamanda siliyer fonksiyonları bozmakta, solunum fonksiyonunu engellemekte ve epitel çoğalmasını inhibe etmektedir[33].

Bir siderofor olan pyoverdin, *P. aeruginosa*'nın metabolizmasında kullanmak üzere demiri bağlamaktadır[12].

2.1.4.8. Proteaz IV

Pseudomonas aeruginosa'nın keratit patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda A, B ve D sürfaktan proteinlerini yıkarak akciğer hasarına neden olmaktadır[10,12].

2.1.4.9. Fosfolipaz C

Fosfolipaz C aynı isimli geni (fosfolipaz C, *plcH*) tarafından kodlanan hemolizindir. Bu toksin hücre zarını ve özellikle fosfatidilkolini hidrolize etmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın patogenezinde sürfaktan yıkımına neden olarak da rol almaktadır. Ayrıca *Pseudomonas'*ın bazı suşları tarafından bir başka fosfolipaz C (*plcN*) geni tarafından kodlanan hemolitik özelliği olmayan toksini sentezlemektedir[10,12,34].

2.1.4.10. Ramnolipid

Pseudomonas tarafından üretilen diğer bir hemolitik aktivitesi olan hemolizindir. Yapısında bulunan ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki göstermektedir. Hücre zarında bulunan fosfolipidlerin fosfolipaz C tarafından yıkımına sinerjistik etki göstererek yardımcı olmaktadır. Ayrıca solunum yolu epitel hücrelerinde mukosilier aktiviteyi azaltmakta ve biyofilm oluşumunda rol almaktadır[35,36].

2.1.4.11. Ekzotoksin A

Pseudomonas aeruginosa'nın patogenezinde önemli rol oynayan birçok salgı sistemi bulunmaktadır. Bunlardan biri olan Tip 2 salgı sistemi tarafından salgılanan ekzotoksin A (*exoA*) en potent toksin olup hücresel yıkımdan sorumludur. Etkisini difteri toksini gibi ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi inhibe ederek göstermektedir[12,37].

2.1.4.12. Tip 3 Salgı Sistemi

Pseudomonas aeruginosa'nın genom dizilenmesinde birçok salgı sistemine sahip olduğu gösterilmiştir. En bilineni Tip 3 salgı sistemi (T3SS) *Yersinia, Salmonella, Shigella ve Pseudomonas* türlerinde bulunmaktadır. T3SS'de mikroorganizma hedef hücre üzerinde por açıp, pilus benzeri bir yapıyla efektör proteinlerini konak hücre sitoplazmasına aktarmaktadır. Bu salgı sistemi konakçı immünitesinden korunmada önemli rol oynamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* virülansında önemli rol oynayan ekzoenzim S (*exoS*), ekzoenzim T (*exoT*), ekzoenzim Y (*exoY*) ve ekzoenzim U (*exoU*) T3SS ile salınan toksinleridir[22,37]. Bu toksinler protein sentezini inhibe etmekle beraber doku invazyonunu ve nekrozu kolaylaştırıcı etkileri de bulunmaktadır[22].

2.1.4.13. Biyofilm Oluşumu

On yedinci yüzyılda Antonie Van Leeuwenhoek, şu anda biyofilm olarak kabul edilen yapıyı kendi dişlerinde bir tür varlık olarak gözlemlemiştir[38]. Biyofilm Costerton ve arkadaşları tarafından 1978 yılında bir yüzeye yapışan ve polisakkaritlerin hücre dışı matrisini üreten yapılandırılmış bir mikroorganizmalar topluluğu olarak tanımlanmıştır[39]. Biyofilm, hem canlı hem cansız yüzeyde birbirlerine yapışan ekzopolisakkaritler, proteinler, hücre dışı DNA ve metabolitler de dahil olmak üzere hücre dışı polimerik maddelerden oluşan matriksine gömülü mikroorganizma topluluğudur[40,41]. İntrensek direnci veya koruyucu mekanizmaları defektli olan bakteriler dahi bir biyofilm içinde büyümeleriyle antibiyotiklere karşı duyarlılıkları azalabilmektedir[42]. *Pseudomonas aeruginosa*, KF hastalarının akciğer epitel hücre yüzeylerinde biyofilm oluşturarak kronik akciğer enfeksiyonuna neden olmaktadır[43].

2.1.5. Quorum Sensing ve Patojenite İle İlişkisi

Başta *P. aeruginosa* olmak üzere birçok bakteri çevrelerini algılamak ve virülansta etkili genlerin ekspresyonunu düzenlemek için kompleks mekanizmalar geliştirmiştir. Bu uyarı mekanizmaları iki bileşenli sinyal iletimi ve otoindükleyiciler aracılığıyla işlev görmektedir. N-açil homoserin lakton (Lux) veya N-butiril homoserin laktonlar otoindükleyici olarak kullanılarak bakteri popülasyonu belirli bir kütleye ulaştığında, virülans genlerinin ekspresyonunu düzenleyen hücrelerin içinde transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu kompleks sinyal mekanizması "quorum sensing (QS) (çoğunluğu algılama)" olarak adlandırılır[10]. Biyofilm oluşumu, salgı sistemleri, akış pompaları, hareketlilik, antibiyotik direnci, aljinat, toksinler, proteazlar ve sideroforlar gibi çeşitli

virülans faktörlerinin üretimi de QS tarafından düzenlenmektedir[44]. Quorum sensing sistemi otoindüktör sentazlar (*las*I ve *rhl*I) ve aynı kökenli trankripsiyon düzenleyicileri (*las*R ve *rhl*R) olmak üzere iki komponentten oluşmaktadır[45].

Pseudomonas aeruginosa'da birbiriyle ilişkili iki ana QS sistemi vardır: *las* ve *rhl* sistemi[22]

Las QS Sistemi: *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanan ilk QS sistemidir. LasB elastaz sistemini aydınlattığı için bu ismi almıştır[22].

rhl QS sistemi: İkinci QS sistemi olup ramnolipid sentezini kontrol ettiği için bu adı almıştır[22].

2.1.6. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları

Klinik örneklerden en sık izole edilen *Pseudomonas* türü olan *P. aeuginosa* hem lokalize hem sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Yirmi birinci yüzyılda dünya genelinde yaşam sürelerinin uzamasıyla hastane enfeksiyonlarında giderek daha önemli rol oynamaktadır. Genellikle nemli olmaya eğilimli olan vücudun hemen her bölgesinde kolonize olabilmekte ve enfeksiyona neden olabilmektedir[10,19,46].

2.1.6.1. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Hem alt hem üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır. Alt solunum yolunda asemptomatik kolonizasyondan şiddetli nekrotizan bronkopnömoniye kadar değişen enfeksiyon skalası mevcuttur. Kisitk fibrozis ve diğer kronik akciğer enfeksiyonu olan hastalar, mekanik ventilasyon, trakeostomi, kateter takılı hastalar, immun sistemi zayıflamış hastalar *Pseudomonas* enfeksiyonu geçirmeye daha yatkın olmakla birlikte klinikleri daha ciddi seyretmektedir. Özellikle KF hastalarında en sık izole edilen mikroorganizma olan *P. aeruginosa*'nın bu hastalarda enfeksiyona neden olan genellikle mukoid formdaki suşlarıdır[10,12,15]. Mukoid morfotip kronik enfeksiyonlardan sorumlu olup eradikasyonu neredeyse imkânsızdır. Kistik fibrozis hastalarında kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu erken mortalitede önemli rol oynamaktadır[47].

2.1.6.2. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa çeşitli primer deri enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Yanık yaralarından oldukça sık izole edilmektedir. Yanık yaralarının nemli yüzeyi, vasküler hasara bağlı nötrofillerin bölgeye gelememesi bu hastaları *Pseudomonas*

enfeksiyonlarına yatkın hale getirmektedir. Bu hastalarda önce yanık bölgesi kolonizasyonu, ardından lokalize vasküler hasar son olarak bakteriyemi sıralaması sık görülen klinik prezentasyondur. Pyosiyanin, pyoverdin üretimine bağlı *Pseudomonas* tarafından enfekte edilen yaralardan mavi-yeşil püy sızıntısı sıkça görülmektedir. Sıcak su muslukları, yüzme havuzu gibi kontamine su ile temasa bağlı olarak folikülit oluşumu da görülmektedir[10,12]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden olan elastaz enzimi akciğer enfeksiyonlarında ve özellikle yanık yaralarındaki enfeksiyonlarda önemli rol oynamaktadır[31]. Ayrıca diyabetik ayak enfeksiyonlarında gram negatif etkenler içerisinde sıklıkla izole edilmektedir[48].

2.1.6.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa özellikle uzun süreli üriner kateterizasyon, cerrahi girişim, obstrüksiyon oluşturabilecek herhangi bir duruma bağlı gelişen komplike üriner sitem enfeksiyonlarında anahtar rol oynamaktadır[12,49]. *Pseudomonas* bakteriyemilerinde, sepsis tablolarında primer odağı yüksek oranda üriner sistem enfeksiyonu oluşturmaktadır[50].

2.1.6.4. Göz Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa hasar oluşturan göz enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bakteriyel keratit olgularında önemli rol oynamakta ve özellikle kontakt lens kullanımıyla ilişkili durumlarda en sık izole edilen bakteridir. *Pseudomonas* keratiti kornea ülseri enfeksiyonlarına, endoftalmiye, son olarak görme kaybına ilerleyen tıbbi acil olarak ele alınmalıdır[1,10]. *Pseudomonas* keratitlerinin agresif seyrinde bakteri tarafından üretilen elastaz, proteazlar ve ekzotoksin A enzimleri rol oynamaktadır[51,52].

2.1.6.5. Kulak Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa uzun süre yüzen kişilerde lokalize kalabilen topikal antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilebilen kulak enfeksiyonuna neden olmaktadır. Ancak yaşlı ve diyabeti olan hastalarda daha tehlikeli kraniyal sinirlere ve kemiklere hasar verebilen malign otitis eksternaya neden olmaktadır[12].

2.1.6.6. Bakteriyemi ve Endokardit

Pseudomonas aeruginosa ile ilişkili bakteriyemi hastane kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonlarının %2-4'ünden sorumludur[53]. *Pseudomonas aeruginosa* özellikle immün sistemi zayıflamış hastalarda mortalitesi yüksek bakteriyemilerin en önemli gram negatif

nedenlerinden biridir. Ölüm oranının yüksek olmasının nedenleri immün sistemi baskılanmış hastaların enfekte olmasının yanında dirençli suşların tedavi edilmesindeki zorluk ve *Pseudomonas'*ın geniş virülans faktörleridir[12,54]. Genellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde görülen deri lezyonu olan ektima gangrenozum *P. aeruginosa'*ya bağlı bakteriyemi de patognomik bir bulgu olarak kabul edilmektedir[55,56]. Bu hemorajik lezyonun oluşumunda elastaz enzimi önemli rol oynamaktadır[10].

Pseudomonas aeruginosa endokarditi nadir görülür ve esas olarak intravenöz ilaç bağımlılarında görülmektedir. Triküspit kapak tutulumu sık olmakla beraber bu tutulum kronik seyirle ilişkilidir[57].

2.1.6.7. Diğer Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa nadiren menenjit, beyin absesi gibi merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına ve hematojen yolla yayılım ile gerçekleşen kemik ve eklem enfeksiyonlarına neden olmaktadır[58]. Ayrıca *P. aeruginosa* farinksten rektuma kadar tüm gastrointestinal sistemde enfeksiyonlara yol açmaktadır[17].

2.1.7. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Antibiyotik Direnci

Şüpheli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının ampirik tedavisi monoterapi ve kombinasyon tedavisini içermektedir. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi, *Pseudomonas'*ın mevcut antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirebilme kabiliyetinden dolayı büyük bir zorluk haline gelmiştir[2]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* (CRPA)'yı neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine kritik ihtiyaç duyulan üç bakteri içinde listelemiştir[59]. Tedavi sırasında gereksiz antibiyotik kullanımı, MDR *P. aeruginosa* suşlarının gelişimini hızlandırarak bu mikroorganizmaya karşı ampirik antibiyotik tedavisinin etkisizliğine yol açmaktadır[60].

Pseudomonas aeruginosa ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, sefotaksim ve seftriaksona intrensek direnç göstermektedir[61]. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde geniş spektrumlu penisilinler (piperasilin ve tikarsilin), sefalosporinler (seftazidim ve sefepim), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (gentamisin ve tobramisin), karbapenemler (meropenem ve imipenem), florokinolonlar (siprofloksasin) ve kolistin düşünülebilir. Ancak bu antibiyotiklere karşı da edinilmiş direnç gelişebileceği akılda tutulmalıdır[62].

Hızla gelişen direnç *P. aeruginosa*'ya karşı aktiviteye sahip yeni ajan arayışına sebep olmuştur ve bu izolatlar için bazı yeni antibiyotikler ve antibiyotik kombinasyonları bulunmuştur. Yeni ajanların bir kısmı şu şekilde sıralanabilir[63] :

1. Beta laktam –Beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları:

•Seftolozan-tazobaktam [64]

•Seftazidim-avibaktam[65]

2. Sefalosporin:

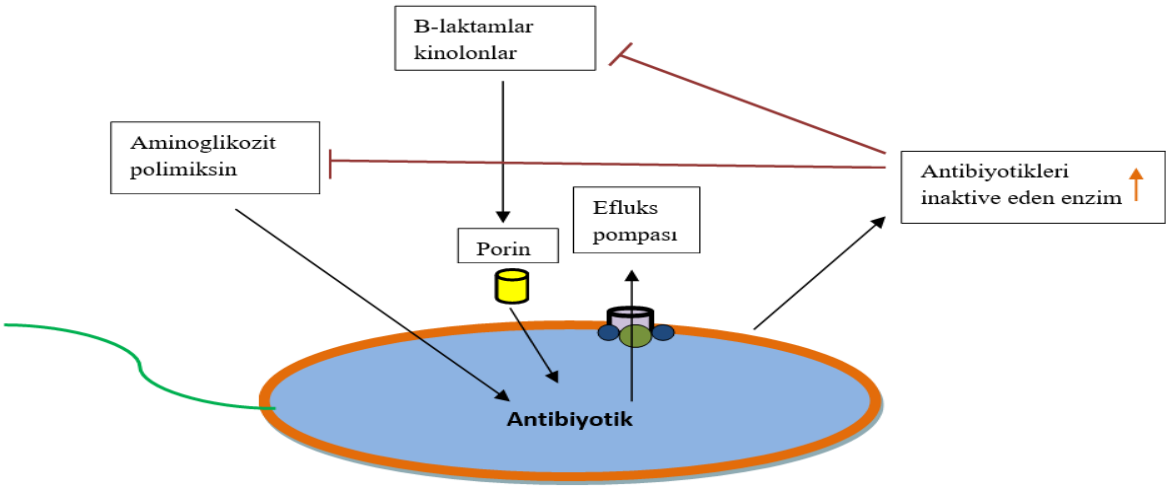
•Sefiderokol [66]

3. Karbapenem-Beta laktamaz kombinasyonu:

•İmipenem-silastatin-rebaktam[67]

2.1.7.1. İntrensek Antibiyotik Direnci

Pseudomonas aeruginosa'nın intrensek antibiyotik direncinin mekanizmaları, azalmış porin geçirgenliğini, artmış efflux pompa aktivitesi ve antibiyotikleri etkisizleştiren enzimlerin üretimini içermektedir. Kinolonlar ve β-laktam antibiyotikler hücre zarlarına porin kanallarından geçer. Aminoglikozidler ve polimiksinler, dış membrandan *P. aeruginosa* LPS'i ile etkileşime girerek kendi alımlarını arttırırlar (Şekil 2)[2]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın porin geçirgenliği oldukça sınırlıdır; *Esherichia coli* (*E.coli*)'nin geçirgenliğinden yaklaşık 12 ile 100 kat daha azdır[68,69].



Şekil 2. *Pseudomonas aeruginosa*'da intrensek antibiyotik direnci mekanizmalarının şematik gösterimi[2]

2.1.7.2. Edinilmiş Antibiyotik Direnci

Pseudomonas aeruginosa'nın yüksek düzeyde intrensek antibiyotik direncinin yanında edinilmiş antibiyotik direnci, *Pseudomonas'*ın ortadan kaldırılmasındaki zorluğu artıran ve daha fazla kronik enfeksiyona neden olan MDR suşların gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır[70].

2.1.7.2.1. Mutasyona Bağlı Direnç

Pseudomonas aeruginosa'nın direnç kazanmasının başka bir yolu, ilaçların hedef bölgesinin, kromozomal DNA mutasyonu yoluyla modifiye edilmesidir. Örn; kinolon hedef enzimleri DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerdeki modifikasyonlar kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır[71,72].

2.1.7.2.2. Direnç Genlerinin Edinimi

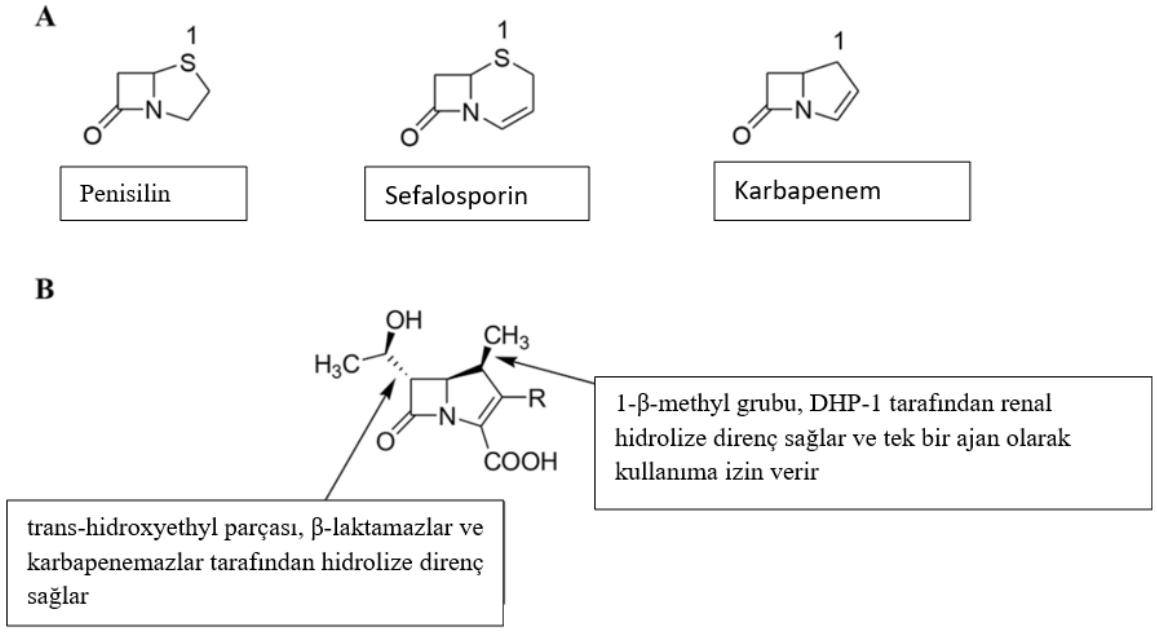
Antibiyotik direnç genleri plazmidler, transpozonlar ve integronlar ile aktarılabilmekte ayrıca bakteriler bu genlere aynı veya farklı bakteri türlerinden horizontal gen transferi yoluyla sahip olabilmektedir[73].

2.1.7.2.3. Adaptif Antibiyotik Direnci

Adaptif antibiyotik direnci, geri dönüşümlü olup bakterinin uyarana yanıt olarak gen, protein ekspresyonundaki geçici değişikliklerden dolayı antibiyotiğin etkisinden kurtulma yeteneğini tanımlamaktadır[74]. *Pseudomonas aeruginosa*'da adaptif antibiyotik direncinin en patognomonik mekanizması, KF hastalarında kronik enfeksiyon ve kötü prognozla sonuçlanan biyofilm oluşumu ile persister hücrelerin oluşumudur[43]. Bakteriler biyofilmini kaybettiğinde antibiyotik duyarlılığını geri kazanabilmesi; biyofilm aracılı direncin genetik mutasyonlardan bağımsız olduğunu, adaptif bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir[75]. Persister hücreler, mikroorganizma topluluklarında rastlantısal olarak oluşan ve antibiyotiklere toleranslı normal hücrelerin metabolik olarak inaktif olan varyantlarıdır. Bu fenotipik varyantlar, KF hastalarında sıkça izole edilmektedir ve *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinin önündeki önemli engellerden biridir[2,76]. Persister hücrelerin antibiyotik varlığında çoğalmamasının kronik enfeksiyonların yeniden ortaya çıkmasında sorumlu olduğuna inanılmaktadır[77].

2.2. Karbapenemler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve "thienamycin" isimli bileşiğin türevi olup sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında metilenin yerine sülfürün geçmesiyle diğer β-laktam ajanlardan ayrılmaktadır. Şekil 3'te penisilin, sefolosporin ve karbapenemlerin β-laktam halkaları hakkında bilgi verilmiştir.



Şekil 3. A. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlerinβ-laktam halkaları B. Karbapenem antibiyotiklerinin önemli yapısal özellikleri (DHP-1: dihidropeptidaz-1)[78].

İlk olarak 1980'lerde Amerika Birleşik Devletleri'nde özellikle genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) üreten bakterileri tedavi etmek için kullanılmıştır. Beta-laktam antibiyotikler içinde en geniş spektrumlu olan gruptur. Meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olup imipenem, panipenem, doripenem gibi farklı etkinliğe sahip karbapenemler ayrıca oksasiline duyarlı *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilere de oldukça etkilidirler. Genellikle yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde enfeksiyon yapan bakteriler üzerindeki konsantrasyondan bağımsız öldürme etkileri nedeniyle diğer antimikrobiyal türlerine göre tercih edilmektedirler. Ancak

Stenotrophomonas maltophilia ve *Enterococcus faecium'*a karşı etkinlikleri yoktur. Ertapenemin, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* 'ye (*A. baumannii*) karşı etkinliği bulunmamaktadır. Meropenem ve imipenem mükemmel bir merkezi sinir sistemi (MSS) penetrasyonuna sahip olmasına rağmen imipenem nöbetler için yüksek riske sahiptir. Doripenem ve ertapenem için MSS penetrasyonu hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Renal yetmezlik için doz ayarlaması gerekebilir, ancak karaciğer yetmezliği için gerekli değildir[78,79,80,81]. Oral emilimleri zayıf olup parenteral kullanılmaları gerekmektedir[82].

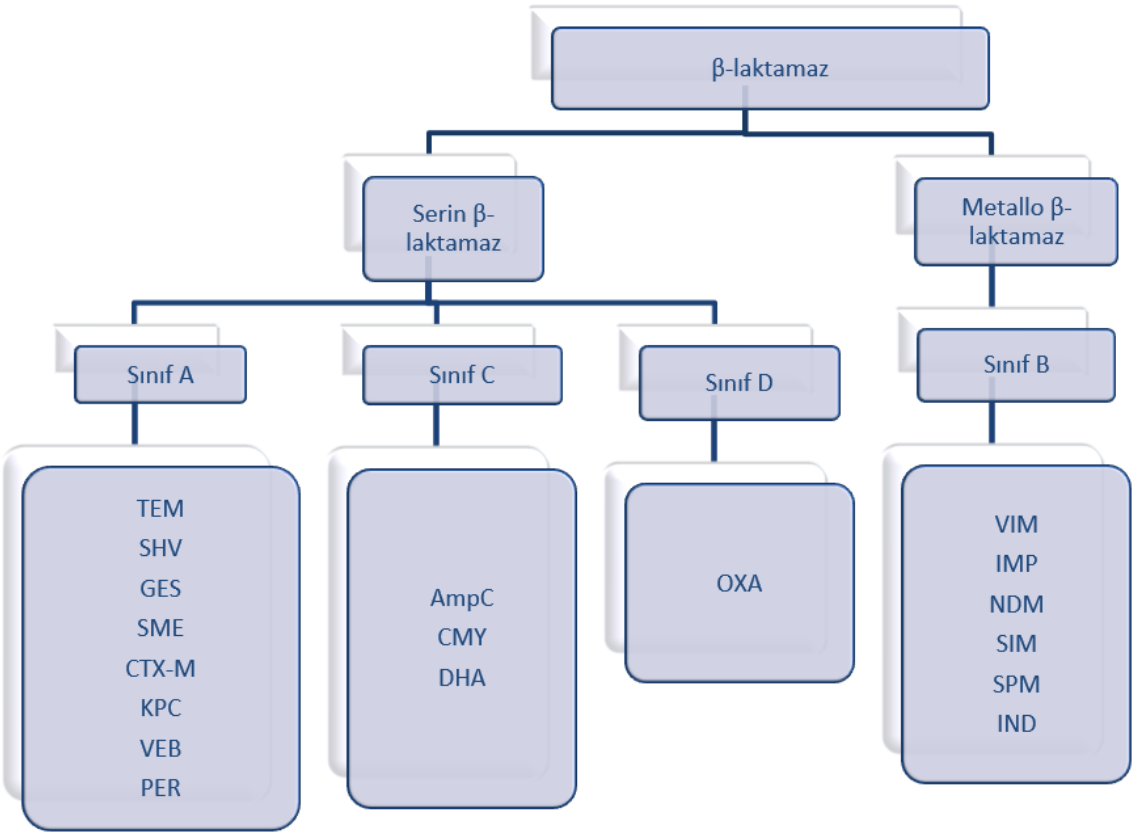
2.3. Karbapenem Direnci

İlk karbapenem olan imipenemin 1980'lerde piyasaya sürülmesinden sonra kazanılmış karbapenem direncinin ortaya çıktığı ilk bakteri *P. aeruginosa*'dır[83].

2.3.1. β-laktamaz

Beta laktam direnci Gram negatif mikroorganizmalarda daha sık tanınmaya başladığından, birçok enterik bakteri ve *P. aeruginosa*'nın türe özgü indüklenebilir kromozomal β-laktamaz ürettiği gösterilmiştir. Ancak, β-laktamlar için daha sinsi bir tehdit oluşturan Gram negatif bakterilerdeki plazmid aracılı taşınan β-laktamazlardır. Günümüzde β-laktamaz kodlayan genlerin farklı yollarla aktarılmasına rağmen esas olarak plazmid aracılığı ile elde edilebileceği bilinmektedir[84].

β-laktamazlar, β-laktam halkasının hidrolizini gerçekleştirme şekline bağlı olarak aktif bir serin bölgesi ile açil enzim oluşturarak veya metallo β-laktamazların aktif bölgelerinden çinko iyonlarına dayalı bir hidroliz reaksiyonu gerçekleştirecek şekilde biyokimyasal olarak iki kategoride sınıflandırılmaktadır. Ambler, Gram negatif bakterilerde A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfa ayrılan β-laktamazların ilk moleküler sınıflandırmasını yapmıştır. A, C ve D sınıfları için aktif enzim bölgesi serin içerirken ve B sınıfı metallo β-laktamazın (MBL) aktif bölgesi Zn^{+2} içermektedir(Şekil 4)[85].



Şekil 4. Beta-laktamazların moleküler sınıflandırılması (Ambler Sınıflaması) [85,86].

2.3.1.1. A Sınıfı β-Laktamaz

Ambler sınıf A enzimleri, *Enterobacterales* ailesinde en yaygın olan sınıftır. Dar spektrumlu β-laktamazlar, GSBL ve serin karbapenemazlar olarak üç gruba ayrılır. Dar spektrumlu β-laktamazlar ve GSBL'ler genel olarak sulbaktam, klavulanat ve tazobaktam tarafından inhibe edilir ve karbapenemleri inaktive edememektedirler. A sınıfı olarak sınıflandırılan β-laktamaz, karbapenemleri parçalayan bir karbapenemaz olmak üzere 1990'ların sonlarına doğru mutasyona uğramıştır. Bu yeni grubun enzim aktif bölgesi serin içermektedir[87,88].

2.3.1.2. B Sınıfı β-Laktamaz

Ambler sınıf B β-laktamazlar karbapenemleri hidrolize ederler ve non-fermentatif bakterilerde sıklıkla gözlenmektedirler[89]. MBL üreten *P. aeruginosa* monobaktamlar hariç tüm β-laktam ajanlarını bozar. Aktif merkezde bulunan Zn^{+2}'ye bağlı enzimatik aktivite,

etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi bir şelatlama maddesi tarafından bastırılır. Metallo beta-laktamaz geni bir integron, transpozon, plazmid, kromozom veya diğer çeşitli genetik moleküller üzerinde bulunabilmektedir[87].

2.3.1.3. C Sınıfı β-Laktamaz

Ambler sınıf C enzimler sefalosporinazlar olarak adlandırılır ve çoğu indüklenebilen kromozomal enzimlerdir. Ancak plazmid aracılığıyla aktarılan sınıf C β-laktamazlar bulunmaktadır. *Enterobacterales* ailesinin büyük kısmında bulunan bu enzimler AmpC tipi β-laktamazlar olarak da adlandırılmaktadır. Sınıf C enzimlerin klavulanik asit veya sulbaktam ile inhibisyonları düşüktür. Yüksek AmpC üretimi seviyeleri karbapenemlere karşı dirence yol açabilir[87,90].

2.3.1.4. D Sınıfı β-Laktamaz

Oksasilinaz (OXA) olarak adlandırılan D sınıfı β-laktamazlar en çok çeşide sahip olup pek çok açıdan en az anlaşılmış olan gruptur. Tanımlanan ilk enzimler penisilinlere karşı sınırlı etkinliğe sahipken, etkinlikleri sefalosporinleri ve karbapenemleri de kapsayacak şekilde genişlemiştir. Gerek birçok üyesi kromozomal olmasına rağmen *P. aeruginosa*'da plazmid kaynaklı sefalosporinazların artması, *A. baumannii* ve *Enterobacteriales*'de karbapenem direncinden sorumlu olan OXA-23 ve 24/40 ve OXA-48 enzimlerinin yayılması, Gram pozitif bakterilerde yakın zamanda OXA enzimlerinin tanımlanması bu sınıfın klinik önemini artırmaktadır[91].

2.4. Karbapenemaz Üretiminin Belirlenmesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaları (CPO) diğer mekanizmalar nedeniyle karbapenem direnci olan Gram negatif organizmalardan ayırt etmek önemlidir, çünkü CPO hastalar arası daha fazla yayılmaktadır[92].

Karbapenemaz üretiminin tanısında kullanılan yöntemler Tablo 2'de görüldüğü gibi ikiye ayrılmaktadır.

Tablo 2. Karbapenemaz üretiminin tanı yöntemleri[93].

Fenotipik yöntemler	Genotipik yöntemler
Kromojenik besiyerleri	PCR
Modifiye Hodge testi	Klonlama ve sekanslama
Karbapenem inaktivasyon metodu	Oligonükleotid hibridizasyonu
İnhibitör bazlı yöntemler (çift disk sinerji testi, kombine disk testli, kombine gradiyentli stripler, vs.)	PFGE
Biyokimyasal yöntemler	MLST
MALDI-TOF	
İmmünokromatografik yöntemler	

2.4.1. Fenotipik Yöntemler

Karbapenemaz üretiminin tespitinde öncelikle karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık fenotipi görülen suşların belirlenmesi gerekmektedir[93]. Bu testler karbapenemaz üretimini tanımlar, ancak spesifik karbapenemazla ilgili daha ileri bilgi verememektedir. Spesifik karbapenemaz grupları hakkında daha fazla bilgi sağlayabilmesi için bazı bu testlerde bazı modifikasyonlar yapılmalıdır. Örneğin, karbapenem inaktivasyon metodu ile tespit edilen karbapenemaz türü hakkında bilgi vermemesine rağmen, teste iki değerlikli katyon şelatör EDTA ilavesi serin ve metallo karbapenemazların ayrımını sağlamaktadır[92,93].

Fenotipik yöntemler içerisinde kromojenik agar, Modifiye Hodge testi (MHT), karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) ve varyantları, karbapenemaz Nordmann – Poirel (Carba NP) testi ve varyantları, kombine disk yöntemi, kromojenik agar, matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), yanal akışlı immunokromatografik testler yer almaktadır[94,95].

2.4.2. Genotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemlerin, basit donanım gerektirmeleri ve kolay ulaşılabilir olmalarına rağmen sonuçlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir[93]. Moleküler yöntemlerin muazzam duyarlılık ve özgüllüğüne rağmen eğitimli personel

gerekliliği, yoğun emek, zaman alıcı ve tüm sarf malzemelerinin ve reaktiflerin maliyeti gibi dezavantajları mevcuttur[81].

2.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Duyarlılık ve özgüllüğünün yüksekliği, hızlı ve fenotipi etkileyen faktörlerden etkilenmeyen yöntem olan moleküler yöntemler artık daha sık kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerde en önemli problem tespit edilecek direnç genlerinin önceden tanımlanması gerekmesidir. Tek bir enzim tipini hedefleyen tekli PCR yöntemleri veya birden çok enzim gen tipini belirleyen multipleks PCR yöntemleri mevcuttur[96,97]. Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* complex (CRAB), karbapenem dirençli *Enterobacterales*'in (CRE) aksine, karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* da karbapenemaz genleri daha az tespit edilmektedir[98]. Yapılan çalışmalar incelendiğinde karbapenemaz üreten *P. aeruginosa*'da en sık saptanan gen bölgeleri VIM ve IMP'dir[99].

2.4.2.2. Moleküler Epidemiyolojide Kullanılan Teknikler

İnfeksiyon hastalıklarının moleküler epidemiyolojisi, mikroorganizmaları birbirleriyle karşılaştırma esasına dayanmaktadır. Temel amaç, tanımlanmış mikroorganizmaların genotipik özelliklerine dayanarak hastalar arasındaki epidemiyolojik bir ilişkiyi tanımlamaktır. Hastalar arasındaki bulaş, klinik tablo ve prognoz için risk faktörlerini tanımlanması için mikroorganizmalar genetik olarak karakterize edilebilir. Bundan dolayı moleküler yöntemler, halk sağlığı problemlerini çözme konusunda müdahale veya hastalık önleme stratejisi oluşturma imkânı sunabilir. Moleküler epidemiyolojide birçok analiz yöntemi kullanılmaktadır. Ana başlık olarak üç sınıfa ayrılır. Bunlardan ilki olan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile PFGE, DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline dayanır. İkinci olarak PCR temelli metodlarda; PCR-RFLP, Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), Repetitive Sequence Based PCR (Rep-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Variablenumber Tandem Repeat (VTNR) yer almaktadır. Üçüncü sınıf olan sekans bazlı tiplendirme yöntemlerinde ise MLST, Microarray ve WGS bulunmaktadır[100,101].

MALDI-TOF MS son yıllarda bu amaçla kullanılan yöntemler arasına girmesine rağmen yukarıda bahsedilen tekniklerle ayrım gücü farkını inceleyen az sayıda araştırma bulunmaktadır[102].

2.4.2.2.1. Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST)

Moleküler epidemiyolojide daha sık kullanılmaya başlanan sekans analiz yöntemlerinden biridir. Bu analiz yöntemi bakteri DNA'sı üzerindeki yapısal genlere ait internal parçalarının, DNA üzerindeki allellerini saptamayı temel almaktadır. Her mikroorganizma kökeni için lokusta bulunan alleller, sekans çeşidi ile allellik profilini tespit etmektedir. Sekans tiplemesi yapılarak MLST ile spesifik direnç geni sıklığı, farklı coğrafik bölgelerdeki allellik profilleri, kökenlerin bölgesel veya global dağılımı görülebilmektedir[103].

2.4.2.2.2. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Bu yöntem bakteri tiplemesi için "üçüncü nesil moleküler yaklaşım" olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin temel prensibi küçük boyutlu fragmanlar da dahil olmak üzere DNA moleküllerinin, elektrik alanını farklı yönlerde periyodik olarak akım vererek elde edilen DNA hareketinin zamana ve boyuta bağlı yeniden oryantasyonu ile ayrılabilmesidir[104]. Büyük DNA molekülleri, elektrik alanındaki değişikliklere yanıt olarak zigzag yaparak agaroz matriksinden geçmektedir. Kısa atım süreleri daha küçük DNA moleküllerin göç etmesine izin verirken daha büyük DNA molekülleri yanıt veremez ve daha arkada kalacak şekilde dizilmektedirler[105].

Bu yöntem kullanımı ile genetik veya epidemiyolojik ilişkiler belirlenebilmektedir. Yapılan çalışmalar, PFGE'nin suşlar arasındaki farklılaşmada ve bakteriyel salgın olasılığını araştırmada yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen PFGE sonucu tiplendirmeler ile epidemiyolojik olarak ilişkili olan hastalardan, çevreden veya hayvanlardan izole edilen suşların aynı kaynaktan çıkmış olabileceğini göstermektedir[106].

Tipik bir PFGE sistemi, güç kaynağı ünitesi, elektroforez odası, soğutma modülü ve PFGE sonuçlarının görüntülenebilmesi için jel dökümantasyon sistemlerinden oluşmaktadır. Bu sistemden veri çıkışı elektroforez bantları şeklinde olup test edilen numunelerin bantlama modelleri ile bakteri klonal ilişki belirlenmektedir[102].

PFGE ile analiz edilen her izolatın bakteriyel genomunun % 90'ından fazlasının DNA fragmanları bant modellerinde gösterilebilmektedir. Mevcut protokol eksiksiz uygulanabilirse, çalışılan izolatın DNA bandı profili hemen her zaman stabil ve tekrarlanabilir özellikte olacaktır. PFGE sonuçları; izolatlar arasındaki epidemiyolojik

ilişki ile yüksek düzeyde uyumluluğa sahip olmasına rağmen gerçek bir filogenetik ilişki sağlanamamaktadır. PFGE'nin en temel kısıtlılığı, kültürü yapılamayan mikroorganizmalara uygulanamıyor oluşudur[104].

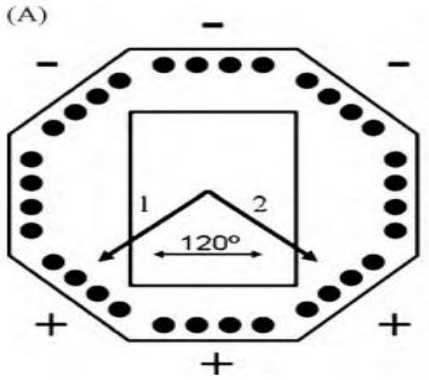
PFGE sonuçları vuruş süresi, voltaj, uygulama açısı, agaroz tipi ve konsantrasyonu, değişme aralığı, sıcaklık ve restriksiyon enziminin özelliğinden etkilenmektedir.

PFGE Çeşitleri

- Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF)
- Rotating Gel Electrophoresis (RGE)
- Field-Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)
- Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis (TAFE)
- Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE)
- Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis (PHOGE)
- Programmable Autonomously-Controlled Electrodes (PACE)[107]

CHEF (Counter-Damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis)

Bu PFGE çeşidi; çok sayıdaki DNA örneğini düz çizgiler halinde homojen elektrik alanı oluşturan çoklu elektrotlar kullanarak ayrıştırmaktadır. Elektrik alanının yönünü elektrotlara uygulanan akım ile elektronik olarak değiştirmektedir. CHEF sisteminde reoryantasyon açısı 120° olup iki alternatif elektrik alanı jel boyunca homojendir. Voltaj altıgen olarak dizilmiş kapalı bir elektrot etrafında elde edilmektedir. Sonuç itibariyle, moleküllerin göçü jel boyunca sabit olduğu için jelde geniş aralıkta DNA moleküllerinin uygun bir çözünürlüğü elde edilmektedir. Bu durum da bantlar arasında daha güvenilir karşılaştırmalara olanak sunar[108]. Şekil 5'te CHEF sistemi şematik gösterimi gösterilmektedir.



Şekil 5. CHEF şematik gösterimi [104].

PFGE Analizi

Tenover ve arkadaşlarının[109] PFGE yorumlanmasında sıklıkla kullandıkları kriterlerine göre, "yakın ilişkili" bakteri suşlarının PFGE bantlama desenlerinde iki ila üç bant farkı vardır, dört ila altı bant farkı olan suşlar "muhtemel ilişkili" olup yedi veya daha fazla bant farkının olması suşların ilişkisiz olduğunu ifade etmektedir. PFGE bant desenlerini kabaca gözlemleme ilk izlenim için yeterli olabilse de, karşılaştırılan bant desenleri arasındaki mesafe arttıkça (yani jeller üzerinde çok yakın olmadıkça) bu şekilde yorumlama giderek daha sınırlı hale gelmektedir. Bundan dolayı analiz için BioNumerics ve GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) gibi bilgisayar destekli ticari olarak mevcut programlar geliştirilmiştir[104,110].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Besiyerleri

3.1.1. Koyun Kanlı Agar (%5) Besiyeri

Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında hazır petri olarak (GBL, Türkiye) hizmet alımı yapılıp kullanım süresine kadar +4ºC'de muhafaza edildi.

3.1.2. Eozin-Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri

EMB agar (Himedia, Hindistan) toz besiyerinden üretici firmanın yapım talimatlarına uyularak hazırlandı. Otoklavda 121ºC'de 15 dakika steril edildikten sonra 45–50ºC'ye kadar soğutuldu. Aseptik şartlarda 50 ml besiyeri, steril plastik veya cam petrilere döküldü ve kullanılana kadar +4ºC'de saklandı.

3.1.3. Luria Bertani (LB) Besiyeri

Luria bertani besiyeri; distile suya %1 oranında Tryptase (Conda Pronadisa, İspanya), %0,5 oranında Yeast Extract (Conda Pronadisa, İspanya), %1 oranında NaCl (Sigma, ABD) eklenip otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edilerek hazırlandı. Steril ependorf tüpünün içine %20 gliserol (Carlo Erba, Fransa) olacak şekilde içine mikroorganizma ekilmiş 16-18 saat bekletilmiş LB eklenerek 1 mL'ye tamamlandı.

3.1.4. Müeller-Hinton Agar (MHA)

Müeller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan) toz besiyerinden üretici firmanın yapım talimatlarına uyularak hazırlandı. Otoklavda 121ºC'de 15 dakika steril edildikten sonra 45–50ºC'ye kadar soğutuldu. Aseptik şartlarda 50 ml besiyeri, steril plastik veya cam petrilere döküldü ve kullanılana kadar +4ºC'de saklandı.

3.1.5. Biyokimyasal Belirteçler İçin Kullanılan Besiyerleri

Biyokimyasal belirteçler için kullanılan besiyerler hazır alındı.

- Triple Sugar Iron (TSI) (GBL, Türkiye)
- Simmons Citrate agar (GBL, Türkiye)
- Urea Agar (GBL, Türkiye)
- Sulfide Indole Motility(SIM) besiyeri (RTA, Türkiye)

3.2.Kullanılan Çözeltiler

- **Tris-HCI (1M) Stok**: 157.6 g Tris hassas terazi ile tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. HCl ile pH 8.0'a ayarlanıp otoklavlandı.
- **EDTA (1M) Stok:** 372.4 EDTA hassas terazi ile tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp NaOH pelletleri yardımıyla pH'sı 8.0'a ayarlanıp otoklavlandı.
- **Hücre Lizis Solüsyonu-1 (HLS-1):** 750 ml steril distile su ile 50 ml Tris (1 M, pH 8.0), 100 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) ve 100 ml %10 Sarkozil (N-Lauroylsarcosine Sodium salt) karıştırıldı. Çalışma esnasında gereken miktarda solüsyona, kullanım öncesinde, son konsantrasyon 0,1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
- **Hücre Lizis Solüsyonu-2 (HLS-2):** 50 ml Tris (1 M, pH 8.0), 100 ml %10 Sarkozil (N-Lauroylsarcosine Sodium salt) karıştırıldı. Çalışma esnasında gereken miktarda solüsyona, kullanım öncesinde, son konsantrasyon 0,1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
- **Etidyum Bromür (10 mg/ ml stok):** 200 µl Etidyum bromür 400 ml distile su ile karıştırıldı.
- **Sarkozil:** 80 ml distile suda 10 g Sarkozil (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt) çözülerek distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- **TE (Tris EDTA):** 20 ml Tris (1 M, pH 8.0) ve 4 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) karıştırıldı. 2000 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su ilave edilip otoklavlandı.
- **HST: Hücre Süspansiyon Tamponu:** 100 ml Tris (1 M, pH 8.0), 200 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) karıştırıldı. 1000 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su ilave edilip otoklavlandı.
- **Kesim Tamponu (10X buffer, 10 U /µl SpeI):** Her bir izolat için 10 µl 10x SpeI tamponu, 2 µl SpeI enzimi (10 U /µl), 88 µl steril ultra saf su karıştırıldı.
- **TBE 10X:** 108g Tris-base, 55 g borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) karıştırıldı. 1000 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su ilave edilip otoklavlandı.
- **TAE 50X:** 242 g Tris, 57.1 ml glisiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) karıştırıldı. 1000 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su ilave edilip otoklavlandı.

3.3. Kullanılan İzolatlar, Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin %5 koyun kanlı (RTA, Türkiye) ve Eozin Metilen Blue (RTA, Türkiye) agara ekimleri yapıldı. Kültüründe üreme olan örnekler, koloni morfolojisi, Gram boyanma özellikleri ve biyokimyasal parametlerine göre incelendi. *Pseudomonas* olduğu düşünülen mikroorganizmalar VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) tam otomatize tiplendirme sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanan mikroorganizmalar 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. Antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST rehberindeki sınır değerlerine göre değerlendirildi[111,112].

Çalışma için Temmuz 2018 ile Mart 2021 tarihleri arasında izole edilen 58 adet CRPA izolatı toplandı. Toplanan izolatların LB sıvı kültürleri moleküler mikrobiyolojik yöntemler gerçekleştirilinceye kadar %20 gliserolde -80°C'de stoklandı. Poliklinik, servis, yoğun bakımda yatan tüm hasta profillerinin yalnızca bir örneği çalışıldı. İlimizde pediatrik örnekler Rize Devlet Hastanesi'nde çalışıldığı için çalışmaya dahil edilemedi.

3.4. Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

3.4.1. Suşların Canlandırılması

Tür düzeyinde tanımlanması ve -80°C stokları yapılmış olan bakterilerden %5 koyun kanlı agar besiyerine aseptik koşullarda seyreltme ekimi yapıldı. Etüvde 37°C'de 18–24 saatlik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edilerek saf olan tek koloniden %5 koyun kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı.

3.4.2. DNA İzolasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu deneylerinde kullanılacak kalıp DNA'lar kaynatma metodu[113] ile yapıldı. Bakteriler seyreltme ekim yöntemi ile %5 koyun kanlı agara ekildi. Bu kültürden saf koloni, LB sıvı besiyerine ekilerek çalkalamalı etüvde 36°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreme gerçeklen LB kültüründen 1 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kısa süreli vortekslenip sonrasında bir dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Dipteki pelete dokunmadan üstteki sıvı faz tamamen çekilip yerine 1 ml steril saf su ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. Yıkama işlemi iki kez tekrar edildi.

Yıkama sonrası elde edilen bakteri süspansiyonu kuru ısıtıcı bloğunda (HLC Biotech, Almanya) 95-100°C'de 15-20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda mikrosantrifüj tüpleri 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 10 dakika soğutmalı santrifüjde (+4 °C) 10000 rpm'de santrifüjlendi. DNA içeren süpernatant kısmından 450 ml steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp etiketlendi. İzole edilen DNA, deney aşamasında kullanılana kadar -20 °C'de saklandı.

3.4.3. Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması

Tablo 3'te verilen reaktifler kullanılarak PCR'lar çalışıldı.

Tablo 3. PCR karışımındaki reaktifler ve miktarları.

Reaktifler	Miktar(µl)
RNAse, DNAse free distile su	18,9
Tampon (10X) (Thermo Scientific, ABD)	2,5
$MgCl_2$ (25mM) (Thermo Scientific, ABD)	1,5
dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)(her biri10 mM) (Thermo Scientific, ABD)	0,5
Primer-F (10 ppm)	0,25
Primer-R (10 ppm)	0,25
Taq Polimeraz (Thermo Scientific, ABD)	0,1
DNA	1
Toplam Hacim	25

Klinik örneklerden izole edilen izolatlarda yedi adet karbapenemaz geni ve virülan suşlarda sık görülen bazı virülans genleri *In-house* PCR yöntemi ile araştırıldı. Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Antibiyotik direnç genlerinin ve virülans genlerinin PCR ile araştırılmasında kullanılan primer dizileri, amplikon büyüklükleri(bp) ve primer bağlanma sıcaklıkları (Tm).

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')	Amplikon Büyüklüğü(Baz Çifti)	Tm	Referans
bla$_{IMP}$	F: CATGGTTTGGTGGTTCTTGT R: ATAATTTGGCGGACTTTGGC	488	56ºC	[114]
bla$_{VIM}$	F: ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R: TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	58 ºC	[114]
bla$_{OXA-48}$	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	442	52ºC	[115]
bla$_{KPC}$	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	55ºC	[116]
bla$_{NDM}$	F: GAGATTGCCGAGCGACTTG R: CGAATGTCTGGCAGCACACTT	497	57ºC	[117]
bla$_{mexy}$	F: CGCCGCAACTGACCCGCTACA R:GGACCACGCCGAAACCGAACG		58	[118]
bla$_{SIM}$	F: TACAAGGGATTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570	52ºC	[119]
exoA	F: AAC CAG CTC AGC CAC ATG TC R: CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT	396	68	[120]
exoT	F: AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G R: TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC	152	58	[120]
exoY	F: CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG R: GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA	289	58	[120]
algD	F: ATGCGAATCAGCATCTTTGGT R: CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	1311	48	[121]
lasR	F:AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG R: GTAGTTGCCGACGACGATGAAG	130	52	[122]
rhlR	F:TGCATTTTATCGATCAGGGC R: CACTTCCTTTTCCAGGACG	133	52	[122]

3.4.4. Amplifikasyon Koşulları

Amplifikasyon aşamasında TC-5000 PCR System (Techne, ABD) ve AB PCR System (Applied Biosystems, Singapur) cihazı olmak üzere iki ayrı cihaz kullanıldı. Cihazlara her gen bölgesi için ayrı döngü parametrileri yüklendi. PCR tüpleri cihaza yüklendikten sonra çalışılan gen dizisine uygun protokol programı çalıştırılıp PCR ürünleri elde edildi. Çalışılan genlere ait döngü parametrileri Tablo 5'te belirtilmiş olup kaynaklar primer bilgilerini içeren tabloda (Tablo 4) belirtilmiştir.

Tablo 5. PCR deneylerinde kullanılan döngü parametrileri.

Gen	İlk Denatürasyon	Siklus sayısı	Denatürasyon	Bağlanma	PrimerUzama	Final Uzaması
IMP	94°C,5 dk.	34	94°C,1 dk.	54°C,1dk.	72°C,50sn.	72°C,7 dk.
VIM	94°C,5 dk.	32	94°C,30sn.	57°C,30sn.	72°C,45sn.	72°C,7 dk.
OXA-48	94°C,5 dk.	34	94°C,1 dk.	55°C,1 dk.	72°C, 50sn.	72°C,7 dk.
KPC	94°C,5 dk.	34	94°C,1 dk.	55°C,1 dk.	72°C,1 dk.	72°C,7 dk.
NDM	94°C,3 dk.	34	94°C,45sn.	52°C,1 dk.	72°C,1.5 dk.	72°C,7 dk.
SIM	94°C, 10 dk.	36	94°C,30sn.	52°C,40sn.	72°C, 50sn.	72°C, 5 dk.
mexy	95°C, 30 sn.	45	95°C, 5sn.	58°C,10 sn.	72°C, 20sn.	72°C,5dk.
exoA	95°C, 2 dk	30	94°C, 1 dk	68°C, 1 dk	72°C, 1 dk.	72°C, 7 dk.
exoT	94°C, 2 dk	36	94°C,30sn.	58°C,30 sn.	68°C, 1 dk.	68°C, 7 dk.
exoY	94°C, 2 dk	36	94°C,30sn.	58°C,30 sn.	68°C, 1 dk.	68°C, 7 dk.
algD	94°C, 5 dk.	30	94 °C,45 sn.	53°C,1 dk.	72°C,1 dk	72°C,7 dk.
lasR	95°C, 2 dk.	30	95°C, 40 sn.	60°C, 1 dk.	72°C, 2 dk.	72°C,10 dk.
rhlR	95°C, 2 dk.	30	95°C, 40 sn.	60°C, 1 dk.	72°C, 2 dk.	72°C,10 dk.

3.4.5. Elektroforez ve Görüntüleme

Elde edilen PCR ürünlerini görüntüleyebilmek için yatay jel elektroforezi kullanıldı. Elektroforez için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Temiz bir beher içerisine 1 gr agaroz (Sigma, ABD) konulup total hacim 1X TAE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında agaroz tamamen çözününceye kadar ısıtıldı. Jel sıcaklığı yaklaşık 50-55°C'ye düştüğünde, içerisine 0.5 µg/ml etidyum bromür solüsyonu eklendi. Elektoroforez yatağına taraklar yerleştirildikten sonra agaroz yatağının içine döküldü ve yaklaşık 30 dakika katılaşması beklendi. Agaroz katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak, elektroforez yatağı içerisinde jel ile birlikte tanka (Cleaver Scientific, İngiltere) yerleştirildi. Jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi. Tarakların oluşturduğu kuyucuklara PCR ürünleri 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılarak (2 µl boyaya 8 µl ürün) yüklendi. Jeldeki ilk kuyucuğa GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) yüklendi. Elektroforezde 100 V'da 60 dakika yürütüldü ve DNR Bio Imaging System (MiniLumi, İsrail) jel görüntüleme sisteminde görüntülendi, fotoğraflandı ve değerlendirildi.

3.5. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Bu çalışmada Durmaz ve arkadaşlarının[109] PFGE protokolü modifiye edilerek uygulandı.

İzolatlar ilk olarak canlandırılması amacı ile stok besiyerinden %5 koyun kanlı agara pasajlandı. 36°C'de gece boyunca inkübe edildi. Saf kültür halinde üreyen koloniler steril plastik öze ile 1 ml HST içinde süspanse edildi ve mikroorganizma yoğunluğu McFarland 4 olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen süspansiyon, 11.200 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı döküldü. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklendi ve pellet homojenize oluncaya kadar vortekslendi. HST'ndan 10 ml alınıp içerisine 0,2gr low melting agar (Bio-rad, ABD) eklendi ve mikrodalga fırında homojenize olmasına dikkat edilerek eritildi.

Karışımın üzerine yavaşça 1 ml %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) ilave edilerek yavaşça karıştırılıp 55°C'deki kuru ısı bloğuna yerleştirildi ve karışımdan 100µl alınarak ısı blok üzerinde bulunan ependorf tüplerine dağıtıldı. Ependorf tüplerine dağıtıldıktan sonra üzerlerine bakteri süspansiyonundan 100µl alınıp pipetaj yapılarak homojen olarak karıştırıldı. Hemen, hücre agaroz-SDS karışımından agaroz kalıp aparatına

dağıtıldı. Kalıplar, +4°C'ye konulup agarozun katılaşması beklendi. 0.5 ml HLS-1 solüsyonu hazırlanıp agaroz kalıplar içerisine konulduktan sonra 37°C'de 1.5 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi (Memmert Wnb-14, Almanya). 1.5 saat sonra HLS-1 solüsyonu dökülerek, yerine 0.5 ml hücre HLS-2 ilave edildi ve 55°C'de 2.5 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

Lizis aşaması yapıldıktan sonra yumuşayan agaroz kalıpların hızlı soğuması için tüpler buz içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra lizis solüsyonu döküldü. Daha sonra kalıplar 55°C'de 2ml steril ultra saf su içerisinde çalkalamalı su banyosunda 3 kez yıkandı. Her yıkama aşamasında su banyosunda 15 dakika bekletildi. Ultra steril su ile yıkama işleminden sonra agaroz kalıpları 55°C'de 2 ml Tris EDTA(TE) tamponuyla yine her yıkama 15 dakika olmak üzere 3 kez daha yıkandı.

Yıkama işlemlerinden sonra örnekler 2 ml TE içerisine eklenerek +4°C'de saklandı. 18-24 saat sonra agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistüri ile 1/3 oranında kesildi. Oluşan parçalar 100 µl 1x SpeI tamponu içine alınarak 37°C derece etüvde 15 dakika bekletildikten sonra bu tampon boşaltıldı. Her agaroz kalıbı için restriksiyon enzim karışımı hazırlandı (10 µl 10x SpeI tamponu + 2 µl SpeI enzimi (10 U /µl) + 88 µl steril ultra saf su). Agaroz kalıbına bu karışım eklenerek etüvde 37°C'de 2.5 saat bekletildi. 2.5 saat sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. 2 litre 0.5x Tris Borik Asit EDTA (TBE) buffer hazırlanıp içerisinden 100 ml ayrıldı. Kalan tampon elektroforez tankına döküldü. Ayrılan 100ml tampon içerisine 1 gr pulsed-field agaroz (Bio-Rad, ABD) eklendi. Bu şekilde %1'lik agaroz hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. SpeI ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirilerek agaroz dökülecek kaset hazırlandı. Tarağın kenar ve ortasındaki dişlerine (ilk ve soldan sekizinci dişe gelecek şekilde) Marker kalıplar yüklendi ve agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Agaroz hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kaset içine döküldü. Oda ısısında 20 dakika bekletildi, agaroz katılaştıktan sonra dikkatlice tarak çekildi ve elektroforez tankına yerleştirildi.

Elektroforez tankına yerleştirdikten sonra CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad, ABD) elektoforez koşulları şu şekilde ayarlandı : Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm^2 , sıcaklık 14°C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu pH=8.0). Elektroforezden sonra jel boyanması için 5 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml distile su içerisine 20 dakika bekletildi. Daha sonra jel, 500 ml saf su

içerisinde 10 dakika bekletilerek dekolorize edildi. UV görüntüleme cihazına (Mini Lumi, İsrail) konularak DNA bantları görüntülenip fotoğrafı çekildi. Çekilen resimler TIFF formatında kaydedildi. Resim 2'de laboratuvarımızda kullanılan CHEF-DR II sisteminin resmi verilmiştir.

Dendogram analizi için PyElph 1.3 programını kullanıldı. Jel bantlarının birbiri ile yakınlık distance' nı %2 olarak belirlendi. %10 benzerlik oranına göre aldığımızda toplam 10 cluster elde edilmiş olup kümeleme analizi olarak ta UPGMA analizi yapıldı.



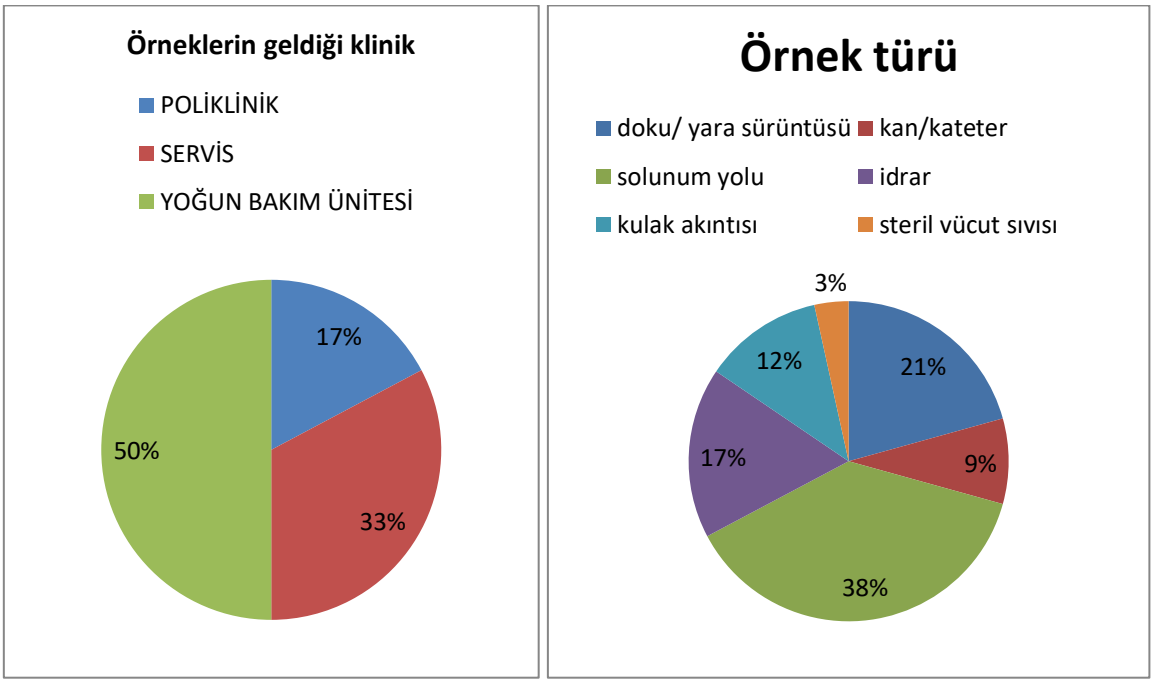
Resim 2. Laboratuvarda bulunan CHEF-DR II sistemi (Bio-Rad, ABD)

3.6. İstatistiki Veriler

Verilerin istatistik analizleri SPSS 25.0 (Statistical PackageforSocialSciences SPSS, Inc., Chicago, Ilinois) paket programı kullanılarak yapıldı. Frekans tabloları, sayı, yüzde gibi tanımlayıcı istatistiklerden faydalanıldı. Tanımlayıcı değerler sayı (n), yüzde (%), ortalama (ort.) olarak; kategorik veriler isesayı (n), yüzde (%) olarak ifade edildi. Kategorik verilerin sıklık oranları arasındaki farkın karşılaştırılmasında Pearson's Ki-kare ve Fisher's uygunluk testleri kullanıldı. Yapılan testler için istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışılan 58 izolatın 29 tanesi (%50) yoğun bakım, 19 tanesi (%33) servis, 10 tanesi (%17) poliklinik hastalarından izole edildi. Bu izolatların 22 (%38) tanesi solunum yolu, 12 (%21) tanesi doku/sürüntü, 10 (%17) tanesi idrar, 7 (%12) tanesi kulak akıntısı, 5 (%9) tanesi kan ve kateter, 2 (%3) tanesi steril vücut sıvısı (ikisi de parasentez) örneklerinden izole edildi. Şekil 6'da klinik örneklerin geldiği hastane ünitesi ve örnek türüne ait bilgiler gösterilmektedir.



A **B**

Şekil 6. A. Örneklerin geldiği klinik **B.** Örnek Türü

4.1.Antibiyogram Sonuçları

Çalışılan tüm izolatlara ait numaralar ve antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. İzolatlara ait antibiyogram sonuçları, örnekleri gönderen klinik ve örnek türü bilgileri.

İzolat numarası	klinik	Örnek türü	IPM	MEM	AK	GN	TOB	CAZ	FEP	CIP	LEV	TZP
H1	ortopedi servis	doku	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R
H2	anestezi YBÜ	kan/kateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H3	dahiliye servisi	yara sürüntüsü	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H4	anestezi YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R
H5	cerrahi YBÜ	balgam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H6	dahiliye YBÜ	kan	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H7	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
H8	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
H9	anestezi YBÜ	idrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H10	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H11	plastik cerrahi polikliniği	doku	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H12	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
H13	cerrahi YBÜ	yara sürüntüsü	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H14	göğüs hastalıkları servisi	lavaj	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H15	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
H16	dahiliye servisi	idrar	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
H17	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H18	dahiliye YBÜ	doku	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
H19	dahiliye YBÜ	yara sürüntü	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
H20	evde sağlık hizmetleri	idrar	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
H21	dahiliye YBÜ	kan	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R

Tablo 6. (devamı)

H22	dahiliye YBÜ	doku	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R
H23	cerrahi YBÜ	kan	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H24	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H25	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H26	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R
H27	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
H28	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H29	ortopedi servis	doku	R	R	I	R	S	R	R	S	S	R
H30	enfeksiyon hastalıkları servisi	doku	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H31	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H32	dahiliye servis	idrar	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
H33	palyatif bakım ünitesi	asit	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
H34	göğüs hastalıkları servisi	TAK	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
H35	dahiliye servis	yara sürüntü	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
H36	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H37	dahiliye YBÜ	idrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
H38	dahiliye polikliniği	idrar	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R
H39	dahiliye servisi	idrar	R	R	I	S	S	R	S	R	R	R
H40	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
H41	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
H42	2.basamak YBÜ	balgam	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R
H43	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
H44	göğüs hastalıkları servisi	TAK	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R

Tablo 6. (devamı)

H45	dahiliye YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R
H46	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
H47	göğüs hastalıkları servisi	balgam	R	I	S	S	S	R	R	S	S	R
H48	anestezi YBÜ	TAK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H49	cerrahi YBÜ	doku	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R
H50	cerrahi YBÜ	TAK	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
H51	dahiliye servisi	kateter	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
H52	dahiliye servisi	parasentez	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H53	covid servisi-9 (beyin cerrahi)	yara sürüntüsü	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
H54	anestezi YBÜ	idrar	R	R	S	R	S	R	R	I	I	R
H55	covid servisi-9 (beyin cerrahi)	TAK	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
H56	KBB polikliniği	kulak akıntısı	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H57	göğüs hastalıkları servisi	idrar	R	R	S	R	S	R	R	I	I	R
H58	acil polikliniği	idrar	R	R	S	R	S	R	I	I	R	R

IPM: imipenem, MEM: meropenem, AK: amikasin, GEN: gentamisin, TOB: tobramisin, CAZ: seftazidim, FEP: seftazidim, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, TZP: piperasilin tazobaktam (S: duyarlı I: orta duyarlı R: dirençli)

İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları yüzde şeklinde Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. İzolatların (n=58) antibiyotik duyarlılık yüzde sonuçları.

Antibiyotik	S, n(%)	I, n(%)	R,n(%)
İmipenem (IPM)	0	0	58(%100)
Meropenem (MEM)	0	0	58(%100)
Amikasin (AK)	29(%50)	5(%8.62)	24(% 41.8)
Gentamisin (GEN)	19(%32.7)	0	39(% 67.2)
Tobramisin (TOB)	30(%51.7)	0	28(%48.2)
Seftazidim (CAZ)	11(%18.9)	0	47(%81.03)
Sefepim (FEP)	10(%17.2)	1(%1.7)	47(%81.03)
Siprofloksasin (CIP)	16(%27.5)	3(% 5.1)	39(%67.2)
Levofloksasin (LEV)	12(%20.6)	2(% 3.45)	44(%75.8)
Piperasillin/tazobaktam (TZP)	5(%8.6)	0	53(% 91.38)
Kolitsin (COL)	58(%100)	0	0

S: duyarlı I: orta duyarlı R: dirençli

4.2. Direnç ve Virülans Genleri Tarama Sonuçları

İzolatların belirlenen direnç ve virülans genlerinin PCR tarama sonuçları Tablo 8'de görülmektedir. Dört izolatta (H17, H18, H21, H22) direnç ve virülans geni tespit edilemedi.

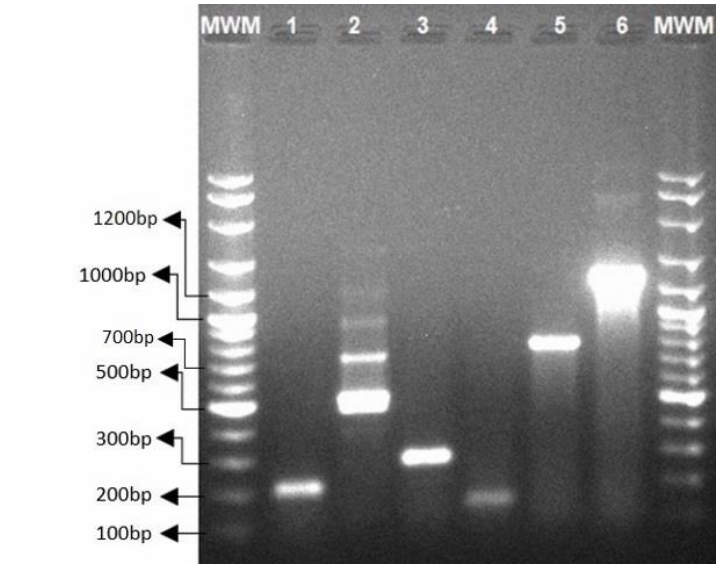
Tablo 8. İzolatlarda PCR ile belirlenen direnç ve virülans genleri.

İzolat no	Direnç geni	Virülans geni
H1	*mexY*	*exoT,*
H2	-	*algD*
H3	*mexY*	-
H4	*mexY*	-
H5	*mexY*	*exoT*
H6	*mexY*	-
H7	*mexY*	-
H8	*mexY*	-
H9	*mexY*	-
H10	*mexY*	*exoT*
H11	*mexY*	*exoT*
H12	*mexY*	*exoY, exoT*
H13	*mexY*	*exoT, algD*
H14	*mexY*	*exoT*
H15	*mexY*	*algD*
H16	*mexY*	*exoT, algD*
H17	-	-
H18	-	-
H19	-	*exoY*
H20	-	*exoY, exoT*
H21	-	-
H22	-	-
H23	-	*exoY*
H24	-	*exoY*
H25	-	*exoY, exoT, algD*
H26	-	*exoY, exoT*
H27	-	*exoY, exoT*
H28	bla_{VIM}	*exoY, exoT*
H29	-	*exoA, exoY, exoT*
H30	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H31	-	*exoY, exoT, algD*
H32	*mexY*	*exoY, exoT*

Tablo 8. (devamı)

H33	*mexY*	*exoY*
H34	-	*exoY, exoT, algD*
H35	-	*exoY, algD*
H36	-	*exoY*
H37	-	*exoY, exoT*
H38	-	*exoY, algD*
H39	-	*exoY*
H40	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H41	bla_{VIM}**,** *mexY*	*exoA, exoY, exoT*
H42	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H43	-	*exoY, exoT, algD*
H44	*mexY*	*exoY, exoT*
H45	*mexY*	*exoY, mexY, algD*
H46	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H47	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H48	bla_{VIM}	*exoA, exoY, exoT, algD*
H49	-	*exoA, exoY, algD*
H50	-	*exoA, exoY, algD*
H51	-	*exoT, algD*
H52	*mexY*	*exoY, exoT, algD*
H53	*mexY*	*exoA, exoY, exoT*
H54	-	*exoY, exoT, algD*
H55	-	*exoA, exoY, exoT, algD*
H56	*mexY*	*exoA, exoY, algD*
H57	-	*exoY, exoT, algD*
H58	-	*exoA, exoY, algD*

Resim 3'te tespit edilen direnç ve virülans genlerine ait jel görüntüsü ve bilgileri verilmiştir.

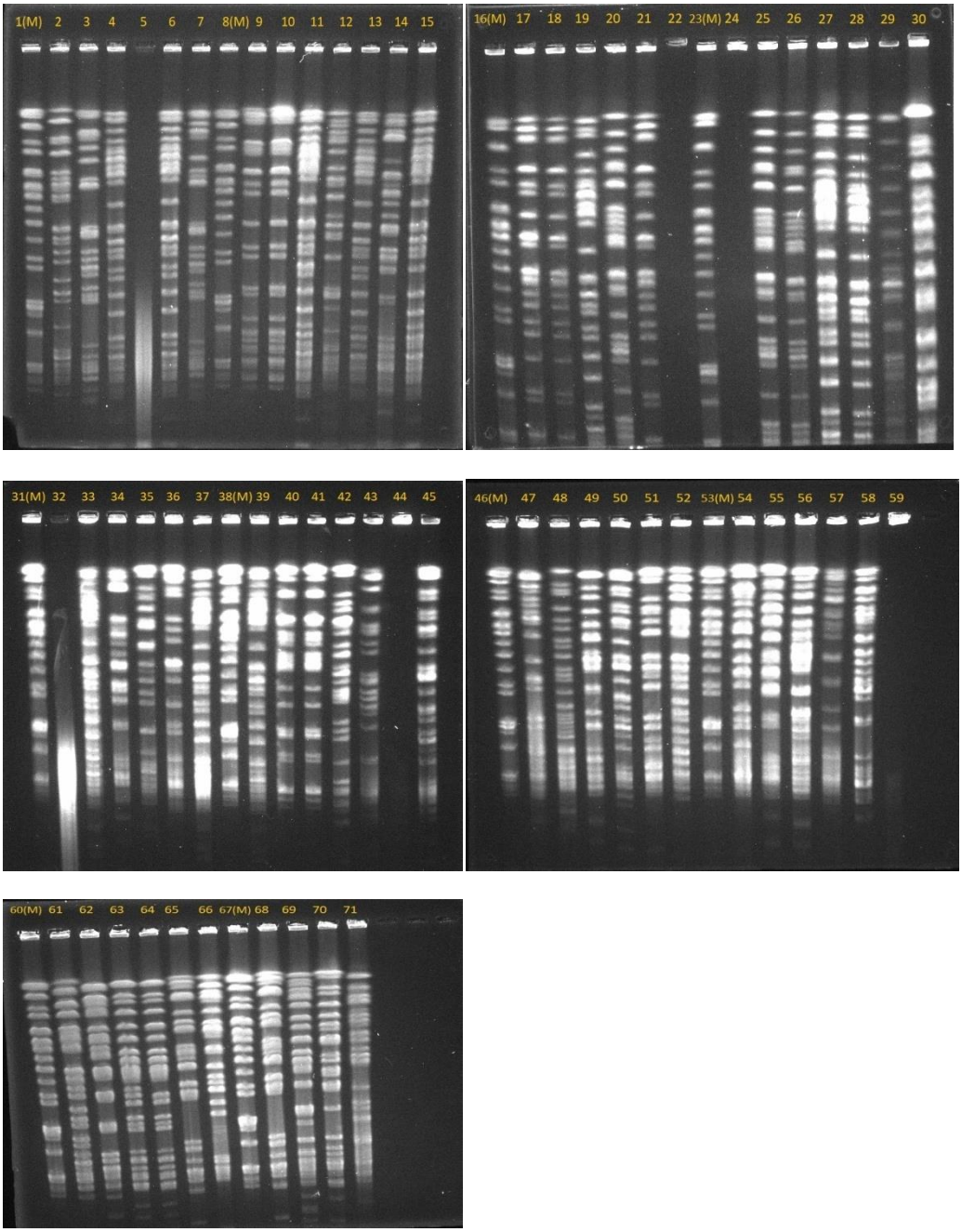


Resim 3. exoY, mexy, exoA, exoT, blaVIM, algD genlerinin agaroz jel ile görüntülenmesi. MWM, Moleculer Weight Marker (Moleküler Ağırlık Marker) (100bp DNA Ladder, Vivantis); 1, exoY geni (289bp); 2, mexy geni (522bp); 3, exoA geni (396bp); 4, exoT geni (152bp); 5, blaVIM geni (780bp); 6, algDgeni (1310bp).

4.3. PFGE Sonuçları

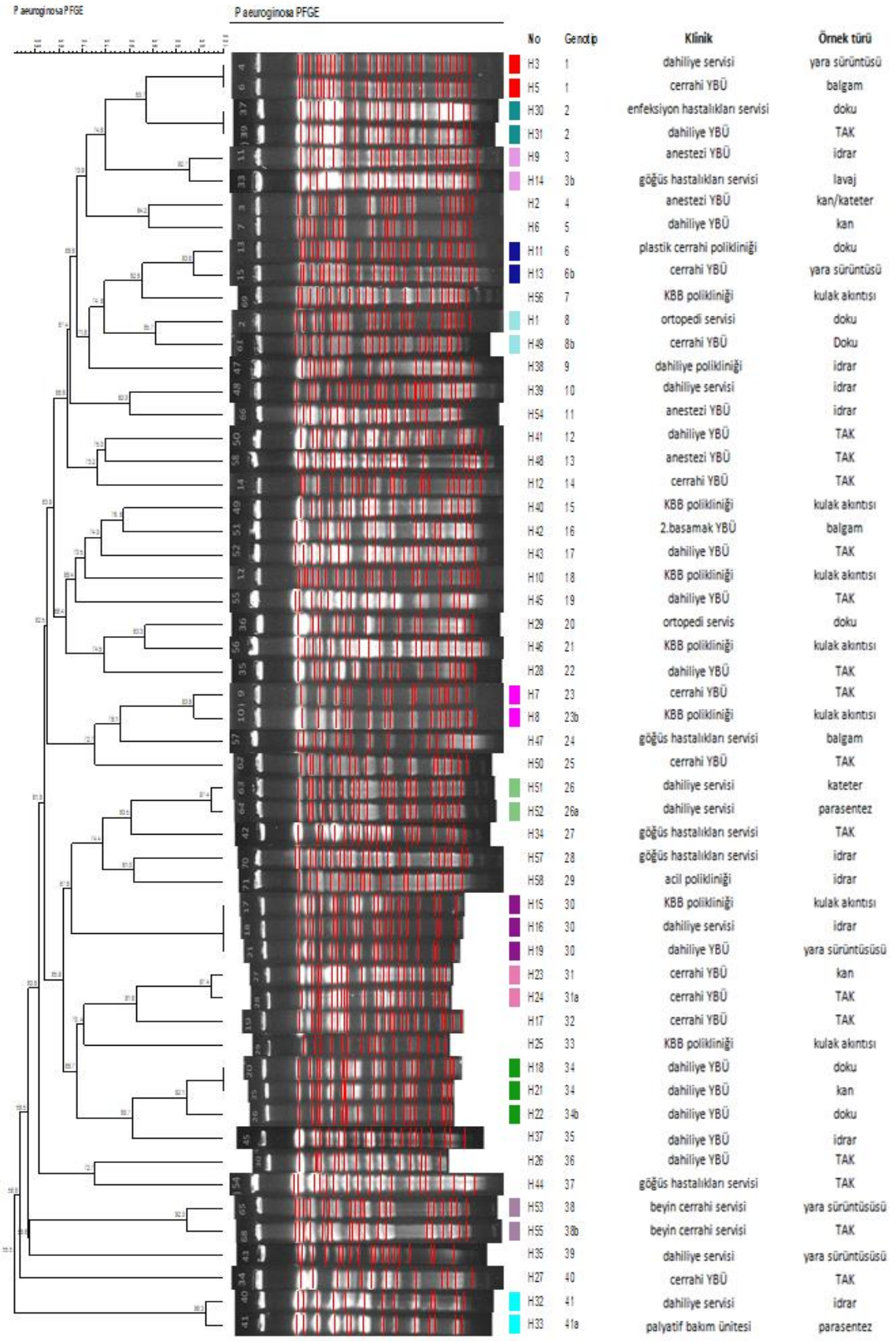
İzolatların üç tanesinde (H4, H20, H36) tekrarlayan çalışmalara rağmen bant görüntüsü alınamamıştır. Değerlendirme aşamasında Marker olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

İzolatların PFGE DNA band görüntüleri Resim 4'te gösterilmektedir.



Resim 4. PFGE jel band görüntüleri (M: Marker)

Şekil 7'de izolatların dendogram görüntüleri verilmiştir.



Şekil 7. PFGE dendogram görüntüleri (YBÜ :yoğun bakım ünitesi, TAK : trakeal aspirat kültürü, KBB: kulak burun boğaz) (orijinal)

Toplam 55 *P.aeuroginosa* izolatının dahil edildiği çalışmada baskın bir salgın suşu saptanmadı. 55 *P. aeuroginosa* izolatı arasında 41 farklı genotip tespit edilmiş olup kümeleşme gösteren izolatlar 12 farklı küme içerisinde toplanmıştır (tolerans 1.0, optimizasyon 1.0, cutoff %85). 55 *P. aeuroginosa* izolatının 26'sı herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı % 47'dir. En büyük kümeler 3 izolatın yer aldığı genotip 30 ve 34 kümeleridir. Diğer kümeler ikişer izolatın yer aldığı genotip 1, 2, 3, 6, 8, 23, 26, 31, 38 ve 41 kümeleridir.

4.4. İstatistik Değerlendirme Sonuçları

Tablo 9'da solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerinden izole edilen bakterilerde taranan direnç ve virülans gen oranlarının istatistiki analiz sonucu görülmektedir.

Tablo 9. Direnç ve virülans genlerinin kategorilendirilmiş örnek türleriyle istatistiki ilişkisi.

Direnç/Virülans Genin(%)	Solunum Yolu Örnekleri(n=22)	Solunum Yolu Dışı Örnekler(n=36)	Toplam(n=58)	p değeri
bla$_{\text{OXA-48}}$	0	0	0	
bla$_{\text{SIM}}$	0	0	0	
bla$_{\text{VIM}}$	3(%5.2)	0	3(%5,2)	0.05*
bla$_{\text{IMP}}$	0	0	0	
bla$_{\text{KPC}}$	0	0	0	
bla$_{\text{NDM}}$	0	0	0	
exoA	4(%6.9)	5(%8.6)	9(%15.5)	0.718*
exoY	17(%29.3)	21(%36.2)	38(%65.5)	0.141**
exoT	15(%25.9)	18(%31)	33(%56.9)	0.175**
algD	9(%15.5)	17(%29.3)	26(%44.8)	0.639**
mexY	10(%17.2)	18(%31)	28(%48.3)	0.737**
lasR	0	0	0	
rhlR	0	0	0	

*Fisher Exact testi, **Pearson ki-kare testi. İstatistiki olarak anlamlı p değerinin altı çizilidir.

Tablo 10'da *exoY* ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu görülmektedir.

Tablo 10. *exoY* geniyle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu.

Antibiyotik n(%)	**Direnç durumu**	***exoY* pozitif(n=38)**	***exoY* negatif (n=20)**	**Toplam (n=58)**	**p değeri**
Amikasin (AK)	S	22(%37.9)	7(%12.1)	29(%50)	0.097**
	R	16(%27.6)	13(%22.4)	29(%50)	
Gentamisin (GEN)	S	16(%27.6)	3(%5.2)	19(%32.8)	0.037**
	R	22(%37.9)	17(%29.3)	39(%67.2)	
Tobramisin (TOB)	S	23(%39.7)	7(%12.1)	30(%51.7)	0.064**
	R	15(%25.9)	13(%22.4)	28(%48.3)	
Seftazidim (CAZ)	S	9(%15.5)	2(%3.4)	11(%19)	0.299*
	R	29(%50)	18(%31)	47(%81)	
Sefepim (FEP)	S	8(%13.8)	2(%3.4)	10(%17.2)	0.468*
	R	30(%51.7)	18(%31)	48(%82.8)	
Siprofloksasin (CIP)	S	12(%20.7)	4(%6.9)	16(%27.6)	0.348**
	R	26(%44.8)	16(%27.6)	42(%72.4)	
Levofloksasin (LEV)	S	10(%17.2)	2(%3.4)	12(%20.7)	0.187*
	R	28(%48.3)	18(%31)	46(%79.3)	
Piperasilin/Tazobaktam (TZP)	S	4(%6.9)	1(%1.7)	5(%8.6)	0.650*
	R	34(%58.6)	19(%32.8)	53(%91.4)	

*Fisher Exact testi, **Pearson ki-kare testi. İstatistiki olarak anlamlı p değerinin altı çizilidir.

Tablo 11'de *exoT* antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu görülmektedir.

Tablo 11. *exoT* geniyle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiki analiz sonucu.

Antibiyotik n(%)	**Direnç durumu**	***exoT* pozitif(n=33)**	***exoT* negatif (n=25)**	**Toplam (n=58)**	**p değeri**
Amikasin (AK)	S	17(%29.3)	12(%20.7)	29(%50)	0.791**
	R	16(%27.6)	13(%22.4)	29(%50)	
Gentamisin (GEN)	S	11(%19)	8(%13.8)	19(%32.8)	0.915**
	R	22(%37.9)	17(%29.3)	39(%67.2)	
Tobramisin (TOB)	S	16(%27.6)	14(%24.1)	30(%51.7)	0.571**
	R	17(%29.3)	11(%19)	28(%48.3)	
Seftazidim (CAZ)	S	5(%8.6)	6(%10.3)	11(%19)	0.504*
	R	28(%48.3)	19(%32.8)	47(%81)	
Sefepim (FEP)	S	3(%5.2)	7(%12.1)	10(%17.2)	0.083*
	R	30(%51.7)	18(%31)	48(%82.8)	
Siprofloksasin (CIP)	S	6(%10.3)	10(%17.2)	16(%27.6)	0.066**
	R	27(%46.6)	15(%25.9)	42(%72.4)	
Levofloksasin (LEV)	S	6(%10.3)	6(%10.3)	12(%20.7)	0.588**
	R	27(%46.6)	19(%32.8)	46(%79.3)	
Piperasilin/Tazobaktam (TZP)	S	0	5(%8.6)	5(%8.6)	<u>0.012*</u>
	R	33(%56.9)	20(%34.5)	53(%91.4)	

*Fisher Exact testi, **Pearson ki-kare testi. İstatistiki olarak anlamlı p değerinin altı çizilidir.

5. TARTIŞMA

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan güçlü silahlardır. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi; özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda ilaçların uygunsuz kullanımı ile artmakta ve küresel bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa* bağışıklığı baskılanmış yatan hastalarda en sık görülen enfeksiyon etkenlerinden biridir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın klinik izolatlarında antimikrobiyal direncin küresel yükünün yüksek olduğu belirtilmektedir [44,59].

Arap yarımadasındaki birçok ülkeden toplam 35 *P. aeruginosa* izolatı ile yapılan çalışmada CAZ %52.31, FEP %46.45, TZP %47.15, CIP % 53.44, IPM %55.5 oranında dirençli tespit edilmiştir. Beta-laktamaz üreten *P. aeruginosa*'da direnç genlerinin oluşumunda anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır[123]. Macaristan'da ve İtalya'da üçüncü basamak hastanelere ait 302 izolatla yapılan çalışmaya ait direnç profili şu şekildedir: CAZ %56.95, LEV %54.97, CIP %52.64, FEP % 49.34, GEN % 33.77, AK %25.82, MEM %23.17, IPM %21.19 ve COL %1.66[124]. ABD'de 122 izolat ile yapılan başka bir çalışmada AK %2.5, GEN %40.2, NET %33.6, TOB %40.2, MEM %18.9 şeklinde direnç profili tespit edilmiştir. Bu çalışmada AK ve GEN dirençli şuslar ile AK ve GEN duyarlı suşların diğer antibiyotiklere direnç profilleri karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görülmüştür[125]. Çin'de yapılan geniş çaplı araştırmada 2015-2019 yıllarına ait direnç profilleri her yıl için ayrı ayrı test edilmiştir. 2015 yılında direnç profili CIP %20.5, LEV %18.1, FEP % 8.1, CAZ % 10.9, IPM %16.6, MEM %11.9, PIP %13.4, TZP %7.9, GEN %9.4, AK % 6.6, TOB %8.7 iken 2019 yılındaki direnç CIP % 12.9, LEV %9.5, FEP %8.3, CAZ % 10.6, IPM % 12.2, MEM % 8.7, PIP % 15.7, TZP % 8.2, GEN %5.1, AK % 4.3, TOB % 5.7 olarak tespit edilmiştir[126]. Ülkemizde 688 tane izolat ile yapılan başka bir çalışmada izolatların en dirençli olduğu antibiyotik CIP %34.7 olarak bulunmuştur. Siprofloksasini sırasıyla %29.4 ve %28.1 direnç oranlarıyla CAZ ve FEP takip etmiştir. Karbapenemler %27.3, TZP %24.6, GEN % 19.3, AK % 7.9 oranında dirençli tespit edilmiş olup izolatların en duyarlı olduğu antibiyotik AK olarak bulunmuştur[127].

Bu tez çalışmasındaki 58 izolatın antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde AK %41.8, GEN %67.2, TOB %48.2, CAZ %81.03, FEP %81.03, CIP % 67.2, LEV %75.8, TZP %91.38 oranında dirençli bulunmuştur. İzolatların tamamı karbapenemlere dirençlidir. Bu çalışmadaki direnç oranının diğer çalışmalara oranla yüksek olması, seçilen izolat kümesinin yarısının yoğun bakım hastalarına ait örneklerin olmasından ve hastanede

yatan hastalarda karbapenemlerin sık kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Yüzde 17 gibi küçük bir dilim olan poliklinik hastalarından gelen örneklerin büyük bir kısmı kulak akıntısı kültürü olup, etken organizma antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermektedir. Kulak akıntı kültür izolatlarında direnç oranının bu kadar yüksek olması örnek alınan kişilerin kronik süpüratif otitis media olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada antibiyotiklere karşı direncin diğer ülkelere göre daha fazla görülmesinin bir başka nedeni ülkemizde gereğinden fazla hastane başvurusu ve bunu takiben antibiyotik kullanım sıklığının artması olabilir.

Bu çalışmada VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) sisteminde kolistin direnci saptanmamıştır. Ancak kolistinin değerlendirilmesinde referans test sıvı mikrodilüsyon testidir[128]. Bundan yola çıkarak kolistin sonucu VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) sonucuna göre rapor edilmemeli ve duyarlılığı hakkında yorum yapılmamalıdır.

Kolistinden sonra en az direnç aminoglikozitlere özellikle AK karşı görülmüştür. Bu durum diğer çalışmalarla[125,127] paralellik göstermekte olup sebebinin aminglikozit direncinden sorumlu olan aminoglikozit modifiye edici enzimin substrat özgüllüğü ve daha az sıklıkta kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Avrupa'da ilk olarak 1990'lı yıllarda keşfedilen karbapenemazlar, endişe verici bir oranda artmaktadır. Genellikle plazmid aracılıdır ve çoğunlukla KPC, VIM, IPM, NDM ve OXA-48 tipleri görülmektedir. Karbepenemazlar esas olarak *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* ve *A.baumannii*'de tanımlanmıştır[123,129]. Karbapenemaz üreten genlerle karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın (CP-CRPA: carbapenemase procuding carbapenem resistant *P. aeruginosa*) tespit etmek bulaşın önüne geçmek için kritik öneme sahiptir[7].

Vallabhaneni ve ark.'nın 6192 izolat ile yaptığı çalışmada izolatların %3'ünü (n:195) CP-CRPA olarak tespit etmiştir. Karbapenemaz üreten izolatların %62'sinin (n:120) bla_{VIM}, %26'sının (n:51) bla_{KPC}, %7'sinin (n: 13) bla_{IMP} ve %6'sının bla_{NDM} olduğu görülmüştür. Aranan genlerden bla_{OXA-48} tespit edilememiştir[7]. Al-Khudhairy ve ark.'ları diyabetik ayak enfeksiyonundan izole ettikleri 97 *P. aeruginosa* izolatını karbapenemaz üretimi açısından önce fenotipik olarak değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucu %12.4 (n:12)'ünün MBL ürettiği saptanmıştır. Fenotipik olarak MBL üretenlerin %33.3 (n:4)'ünde bla_{VIM}, %25 (n:3)'inde bla_{IMP}, %16.6 (n:2)'sında bla_{SPM}, %16.6 (n:2)'sında bla_{SIM} ve %8.3 (n:1)'ünde bla_{NDM} tespit edilmiştir[130]. Liew ve ark. Yaptığı çalışmada 53 *P. aeruginosa* izolatında fenotipik karbapenemaz üretimi taranmıştır. Üç

izolatta (%5.6) MBL üretimi tespit edilmiş ve genotipik olarak taranmıştır. Bu üç izolatın her birinde *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$ saptanmış, *bla*$_{KPC}$ tespit edilmemiştir[131]. Mısır'daki iki üniversite hastanesinden toplanan izolatlar önce antibiyotik duyarlılıkları yönünden değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu 50 tanesi (%43.8) MDR fenotipi göstermiş olup bu izolatlardan 14'ünün (%12.2) IPM dirençli olduğu görülmüştür. İmipenem dirençli olan izolatların 13 (%11.4) tanesi MBL fenotipi sergilemiştir. Fenotipik olarak MBL üretimi sergileyen *P. aeruginosa* izolatlarında genotipik değerlendirmede IPM dirençli izolatlarda *bla*$_{VIM}$ geni %57, *bla*$_{IMP}$ geni %35 oranında tespit edilmiştir[8]. Sabour ve ark.'ları ABD Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından geliştirilen Antibiyotik Direnç Laboratuvar Ağı'nın (AR Lab Network) üç yıllık CRE, CRPA, CRAB'nin karbapenemaz gen tespiti için tarama sonuçlarını özetlemişlerdir. Değerlendirilen 76.887 tarama izolatının 30.390 CRPA olup bu izolatların da %2'si (n = 672) CP-CRPA bulunmuştur. En sık saptanan karbapenemaz geni *bla*$_{VIM}$ (%62; n = 414) ardından *bla*$_{KPC}$ (%25; n = 171) olduğu görülmüştür. On beş CP-CRPA izolatı, birden fazla gen için pozitif tespit edilmiştir. Bu araştırmada da aranan genlerden *bla*$_{OXA-48}$ tespit edilememiştir. MBL genlerinden *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{NDM}$ veya *bla*$_{VIM}$'i barındıran CRPA izolatları, test edilen karbapenemler arasında en yüksek direnç frekansını göstermiştir[132]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada bir yıllık sürede toplanan karbapenem duyarlı olmayan izolatın karbapenemaz üretimini değerlendirmek için önce fenotipik testler daha sonra genotipik testler uygulanmıştır. İncelenen *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{SPM-1}$, *bla*$_{GIM-1}$, *bla*$_{SIM-1}$, *bla*$_{NDM-1}$ MBL direnç genlerine rastlanmamıştır[6]. Ozgumus ve ark.'nın Trabzon bölgesinde yaptığı çalışmada 100 *P. aeruginosa* klinik izolatında *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP-1}$ genleri PCR yöntemi ile taranmıştır. Bir (%1) izolatın *bla*$_{VIM}$ geni taşıdığı, dokuzunun (%9) ise *bla*$_{IMP-1}$ geni taşıdığı görülmüştür[133]. İnönü Üniversitesinde yapılan bir araştırmada toplanan 29 karbapenem dirençli izolat karbapenemaz üretimini değerlendirmek için fenotipik testler yapılmıştır. Fenotipik testlerin sonuçlarından bağımsız olarak tüm izolatlarda *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{SPM}$, *bla*$_{GIM}$ genleri aranmış olup hiçbiri tespit edilememiştir[134].

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar genellikle belirledikleri izolatlarda karbapenemaz üretimi tespit edebilmek için genotipik olarak taramadan önce fenotipik testler uygulamış veya antibiyotik direnç profil taraması yapmışlardır. Bu iki yöntemi ayrı ayrı uygulayanların yanında ikisini birden yapan araştırmacılar pozitif olanları seçip CP direnç genlerini genotipik olarak araştırmışlardır. Bu şekilde bir algoritma izlenmesinin

sebebi CP direnç genlerini daha yüksek oranda tespit edebilmek olduğu gibi, genotipik testlerin maliyetinin diğer testlere göre fazla olması, tecrübeli eleman gerektirmesi, çalışma koşullarının hassas olduğu için gereksiz çalışmanın önüne geçilmek istenmesi olabilir.

Bu çalışmada da öncesinde karbapenem dirençli tespit edilen 58 *P. aeruginosa* izolatı işleme alındı ve üç tanesinde (%5.1) *bla*$_{VIM}$ geni tespit edildi. Araştırılan diğer karbapenemaz genlerinden hiçbiri tespit edilememiş olup, gen birlikteliği de görülmedi. Ülkemizde yapılan bir çalışmada karbapenem duyarlı olmayan ve fenotipik MBL üretimi tespit edilern bir *P. aeruginosa* izolatında *bla*$_{VIM}$ geni tespit edilmiş olup sekans analizi sonucu *bla*$_{VIM-5}$ genine yakın yeni bir *bla*$_{VIM}$ varyantı belirlenmiştir[135]. Mevcut çalışmada tespit edilen genlere sekans yapılamamıştır. Bu tez çalışmasının sonuçlarıyla örtüşen araştırmalar olduğu gibi daha yüksek oranda gen tespiti yapan araştırmalar da mevcuttur. Bu çalışma sonuçlarıyla örtüşen araştırmalar daha çok ülkemizde yapılan çalışmalardır. Bu durum diğer ülkelere göre ülkemizde *P. aeruginosa'*nın karbapenem direncinin karbapenemaz gen üretimi dışındaki mekanizmalara da yüksek oranda bağlı olabileceği anlamına geldiği düşünülebilir.

Tespit edilen direnç genleri ile örnek türü arasında anlamlı bir ilişki arandı ve *bla*$_{VIM}$ pozitifliği tespit edilen üç izolatın hepsinin solunum yolu örneği olduğu görüldü. Ancak örnekleme sayısının yetersiz oluşu istatistiki olarak yorumlamanın önünde engel teşkil etmektedir.

Bu çalışmada karbapenem dirençli izolatlar seçilmesine rağmen karbapenemaz gen oranlarının düşük tespit edilmesi *Pseudomonas'*ın direnç profilinin değişken olması, aranan genler dışındaki direnç genlerini taşımış olabileceğini, porin kaybı ve efluks pompalarında aktivite artışı gibi diğer direnç mekanizmalarının dirence sebep olabileceği öngörülebilir. Mevcut çalışmada sadece *bla*$_{VIM}$ pozitifliği saptanması *Pseudomonas'*ta *bla*$_{VIM}$ ve *bla*$_{IMP}$ genlerinin sık görüldüğü çalışmalarla[8,136] örtüşmektedir. İzolat sayısının daha fazla olması halinde saptanacak gen çeşitliliğinin de arttırabileceği düşünülmektedir. El-Domany ve ark. yaptıkları çalışmada *bla*$_{VIM}$ ve *bla*$_{IMP}$ genlerini içeren izolatların MDR, XDR ve PDR fenotipi sergilediğini görmüşlerdir[8]. Çalışmamızda karbapenemaz geni pozitif çıkan üç suşun hepsi XDR profili sergilemektedir (Kolistin duyarlı kabul edilmiştir).

*Pseudomonas aeruginosa'*nın zayıf ilaç duyarlılığının iki aktif akış sisteminin, yani MexAB-OprM ve MexXY-OprM'nin aktivitesiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Jeannot ve

ark. yaptığı bir çalışmada ribozom inhibitörü antibiyotiklerin antimikrobiyal ile karşılaşmamış bakterilerde anlamlı oranda *mexY* ekspresyonunu indükleyebildiği tespit edilmiştir[136].

Rostami ve ark.'ları tarafından karbapenem duyarlı olmayan *P. aeruginosa* izolatının ana direnç mekanizmalarının sıklığı araştırılmıştır. Karbapenem dirençli bulunup MBL üretimi tespit edilemeyen 19 izolat arasında *mexB* aktivite artışı (n:12 , %63.2) en sık görülen mekanizma olup bunu *mexY* aktivite artışı (n: 10, %52.6) izlemiştir. İzolatlarda karbapenem direnci ile efluks pompası aktivite artışı veya azalmış *oprD* salgılanması arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca araştırmacılar tarafından yalnızca *mexY* aşırı salgılayan izolatlarda bu durumun imipenem ve meropenem için yüksek MİK ile ilişkilendirilebileceği söylenmiştir[137]. Tahran'da yapılan bir araştırmada 40 CIP duyarlı olmayan *P. aeruginosa* izolatlarının direnç profillerini belirlemeyi ve CIP duyarsızlık mekanizmalarını araştırmayı amaçlamıştır. On dört izolatta (%35) efluks pompası genleri pozitif bulunmuştur. Bu 14 izolatın dört tanesinin (%28.5) *mexY* olduğu görülmüştür. Efluks pompası genlerinin pozitifliği ve CIP için yüksek MİK değeri arasında anlamlı ilişkili bulunmamıştır[138]. Muderris ve ark. 80 karbapenem dirençli izolatın karbapenem direnç mekanizmalarını ve klonal ilişkilerini araştırmışlardır. Aranan karbapenemaz genleri (*bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA}$) dokuz izolatta (%11.3) pozitif bulunmuştur. Çalışılan izolatların yaklaşık %25'inde birden fazla karbapenem direnç mekanizması tespit edilmiştir ve çalışmada karbapenem direnci çoklu mekanizmalar ile ilişkilendirilmiştir. Çalışılan izolatların sırasıyla %17.5 ve %28.8'inde *mexD* ve *mexY* geni tespit edilmiştir. Bu iki gen pozitif tespit edilen izolat %2.5 olup bu izolatlarda IPM MİK seviyeleri yüksek bulunmuştur[4].

Bu çalışmadaki izolatların 28 tanesinde (%48.2) *mexY* pozitif olarak bulundu. Bu oran bu konuda yapılan araştırmalar ile örtüşmektedir. Yalnızca bir izolatta *bla*$_{VIM}$, *mexY* pozitifliği beraber görüldü. Bu tek izolat solunum yolu örneğidir ancak *mexY* pozitifliği ile örnek türü arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Ayrıca *mexY* pozitifliği ile herhangi bir antibiyotik direnci arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. MexXY aşırı salgılanmasının sefepim direnci ile ilişkili olduğu çalışmalar[139] mevcut olmasına rağmen bu çalışmada anlamlı bir ilişki görülmedi.

Direnç probleminin yanında *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu virülans faktörleri enfeksiyonun ve tedavinin seyrini değiştirebilmektedir. En toksik virülans faktörlerden

olan *exo A* doku lizisi ve bakteri invazyonunda rol alır. *ExoS, exoT, exoY* ve *exoU* çalışılan mikroorganizmanın tip 3 salgı sistemiyle salgılanan toksinleridir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait en önemli virülans faktörlerinden biri biyofilm oluşumudur. Aljinat biyofilm matriksinin ana elemanı olup GDP-mannoz 6-dehidrojenaz (AlgD) yapısındaki proteinlerden biridir. Ayrıca *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerinin düzenlenmesini sağlayan QS sistemidir. Bu sistem de *las* ve *rhl* genleri tarafından düzenlenmektedir[5,140]. Virulans faktörlerinin büyük kısmı kromozomal olarak kodlanmıştır ve bunlara ait gen dizisi *P. aeruginosa* PAO1 suşu genomunda belirlenmiştir[141].

Elmouaden ve ark. çalışmasında izole ettikleri 155 *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını değerlendirip virülans genlerinin *lasB* (%98.7), *exoS* (%98.7), *plcH* (%96.1) ve *algD*'nin (%87.7) olduğu görülmüş olup en az tespit edilen genin %74.2 ile *exoA* olduğu belirtilmiştir. İstatistiki değerlendirmede virülans faktör genlerinin prevelansı ile antibiyotik duyarlılık profili arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir[5]. Ürdün'de yapılan bir başka araştırmada 61 *P. aeruginosa* izolatında taranan virülans genleri *algD, lasB, exoA, exoS* ve *exoU* yüzdeleri sırasıyla %98, %98, %80, %33 ve %33 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada antibiyotik direnci ve direnç genleri ile virülans genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır[142]. Emaneini ve ark.'nın KF hastasından toplanan 85 klinik *P. aeruginosa* izolatına antibiyotik duyarlılığı test edilmiş ve tip 3 salgı sistemiyle salgılanan toksin kodlayan *exoS, exoT, exoY* ve *exoU* genleri aranmıştır. Aranan virulans genlerden *exoT* tüm izolatlarda mevcut olup, *exoS* ve *exoY* %70'in üzerinde, *exoU* %35 olarak tespit edilmiştir[143]. Polonya'da 107 karbapenem dirençli izolat karbapenemaz direnç genlerinden bla_{VIM} ve bla_{IMP} ve belirlenenen virülans genleri taranmıştır. İncelenen suşların 32'sinde (%29.9) bla_{VIM} geni saptanırken, hiçbirinde bla_{IMP} geni tespit edilememiştir. Virülans genlerinden *exoT, phzM* ve *phzS* genleri tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Geri kalan genlerin dağılımı şu şekildedir; *exoY* %99.1, *exoU* %96.3, *exoA* %92.5, *algD* %58.9. Karbapenemaz pozitif ve karbapenemaz negatif CRPA izolatları arasında virülans genlerinin görülme sıklığı karşılaştırılmıştır. Karbapenemaz üreten CRPA'da pozitif anlamda en anlamlı fark *exoS* ve *pilA* genlerinde görülmüştür[9]. Alonso ve ark.'ları ventilatörle ilişkili pnömoniye (ventilatör associated pneumonia, VAP) neden olan *P. aeruginosa* izolatlarıda taranan virülans genlerinden *algD, lasB, plcN, plcH* ve *exoT* tüm izolatlarda bulunmuştur. *LasI, lasR, exoY, rhII, rhIR* izolatların sırasıyla %98, %97, %93, %82, %81'inde tespit edilmiştir. Virülans faktörlerinin dağılımı açısından da VAP olan grup ile VAP olmayan grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir[144]. Mısır'da yapılan bir

başka çalışmada QS bağımlı virülans faktörlerinin tahmin edilmesi ve bunu QS genlerinin varlığıyla ilişkilendirmeye çalışılmıştır. QS genler olarak da *lasR* ve *rhlR* genleri aranmış olup sırasıyla %94(n: 47) ve %90 (n:45) olarak bulunmuştur[145]. El-Mahdy ve ark.'ları tarafından 80 izolat ile bir çalışmada karbapenemaz genleri ve QS genleri (*lasR, rhlR*) taranmıştır. Taranan QS genleri tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Karbapenem direnci ile çalışılan QS genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır[146]. Bıyık ve ark.'larının yaptıkları çalışmalarında kan kültürlerinden izole ettikleri karbapenem duyarlı *P. aeruginosa* (CSPA) ve karbapenem dirençli *P. aeruginosa* (CRPA) izolatlarında belirlenen virülans genleri (*exoA, algD, plcN, lasB, plcH*) taranmıştır. Her iki grubun tamamında *algD, lasB* ve *plcN* gen bölgeleri tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada karbapenem dirençli ve duyarlı izolatlarda virülans genlerin görülme oranı benzer bulunmuştur[3]. Pamukkale üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarında kan kültürlerinde üretilen *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm oluşumu, T3SS , ilişkili genler ve antibiyotik dirençleri araştırılmıştır. Araştırılan virülans faktörleri yoğun bakım örnekleri ve diğer örnekler olarak değerlendirilmiştir. Bulunan sonuçlara göre yoğun bakım örneklerinde virülans faktörleri anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. Aynı zamanda virülans faktörleri ve virülans genleri pozitif olan izolatlarda antibiyotik direnci daha yüksek bulunmuştur. Aranılan T3SS virülans faktörlerinden *exoY* ve *exoT* tüm izolatlarda, *exoS* 88 izolatta (%88), *exoU* 27 izolatta (%27) bulunmuştur. Biyofilm genleri pozitif saptanan suşlarda Tip 3 sekresyon sistemi genlerinden en az biri saptanmış olup, *P. aeruginosa*'da biyofilm ve T3SS'nin antibiyotik direncine katkı sağlayan önemli virulans faktörlerinden olduğu yorumu yapılmıştır[147]. Ülkemizdeki yapılan bir başka çalışmada QS üretiminden sorumlu olan (*lasI, lasR, rhlI, rhlR*) genlerinin taranması ve bu genlerin bazı virülans faktörlerinin (elastaz, pyosiyanin, biyofilm oluşumu, kayma hareketi) üretimiyle kıyaslanması amaçlanmıştır. PCR analizi sonucunda 46 izolatta tüm genler pozitif bulunmuş olup dört izolatta *lasR* tespit edilememiştir. Araştırmacı QS genlerinin bulunmaması veya mutasyonu gibi durumlarda virülans faktörlerinin üretiminde azalma tespit etmiştir. Ancak bu durumun izolatların enfeksiyon oluşturmalarını engellemediğini de belirtmiştir[148].

Bu çalışmada 58 izolatta taranan virülans genleri şu şekilde tespit edilmiştir; *exoY* %65.5, *exoT* %56.8, *algD* %44.8, *exoA* %15.5. Quorum sensing genleri (*lasR* ve *rhlR*) hiçbir izolatta görülmemiştir. Bu çalışmada tespit edilen virülans genlerinin hem ülkemiz, hem dünya geneli sonuçlara göre daha düşük oranda olduğu görülmektedir. Önem ve ark.'larının çalışmalarının[148] sonucuyla uyumlu olarak bu çalışmada da QS genlerinin

tespit edilememesi virülans faktör genlerinin daha düşük oranda tespit edilmesiyle ilişkili olabilir. *exoY* ve *exoT*'nin T3SS'nin en sık tespit edilen virülans genleri olduğu çalışmalar[144,147] mevcut olup bu çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Başta *algD* olmak üzere *P. aeruginosa*'ya ait birçok virülans faktörünün ve genlerinin solunum yolu örneklerinde tespit edilme oranı diğer örneklere göre daha yüksek olduğu çalışmalar mevcuttur[142]. Bu çalışmada ise virülans genlerinin görülme sıklığı ile solunum yolu ve solunum dışı örnekleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Virülans genler örnekler iki kategori halinde değil (solunum, solunum dışı) tek tek değerlendirildiğinde en sık solunum yolu örneklerinde tespit edildiği görülmektedir. Ancak diğer örneklerin (örn; parasentez) sayısının az olması istatistiki olarak değerlendirmeye uygun olmadığı için iki kategori halinde değerlendirildi.

Tespit edilen virülans genler ile antibiyotik dirençleri arasında ilişki arandı. *ExoT* ile TZP direnci arasında anlamlı bir ilişki bulundu (p: 0.012). Ancak TZP duyarlı izolat sayısının sadece beş tane olmasının yorumlama açısından yanıltıcı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. *ExoY* negatif izolatlarda GEN direnci daha yüksek oranda tespit edildi (p: 0.037). Hala virülans genleri ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki belirsiz olup daha fazla ve çok örneklemli çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

Fenotipik özellikler kullanılarak klonal, baskın veya bulaşıcı izolatların tanımlanması mümkün değildir ve bunun yerine moleküler genotipleme analizleri gerekmektedir[149]. Moleküler tiplendirmede kullanılan kısıtlanmış genomik DNA fragmanlarının PFGE'si, yakından ilişkili Gram negatif bakterilerin tiplendirilmesinde yüksek ayırt edici güce sahip olduğu için sıklıkla tercih edilen bir tekniktir[150].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara bakıldığında klonal olmayan popülasyon yapısı görüldüğü söylenebilir. Bu çeşitliliğin çalışmadaki örneklemin yaklaşık üç senede toplanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Polonya'da 11 farklı hastaneden toplanan izolatlarla yapılan çalışmada benzer epidemiyolojik sonuçlar sunulmuştur[151].

PFGE analizinde bant profili tamamen aynı veya yakın ilişkili olan suşlar ile demografik veriler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. İzolatların yarısının yoğun bakım kökenli olmasıyla uyumlu olarak kümeleşme gösteren izolatlarda yoğun bakım örnekleri daha fazla görülmüş olmasına rağmen anlamlı değildir. Kosova'da yapılan bir araştırmada moleküler özellikle yoğun bakım ünitelerindeki izolatlar arası çapraz bulaş olduğundan bahsedilmiştir. Kümeleşme gösteren izolatların ayırt edilemezliğine vurgu

yapılmıştır[152]. Slekovec ve ark.'larının yaptığı başka bir çalışmada da benzer şekilde çapraz bulaş tespit edildiği belirtilmiştir. Ayrıca yaptıkları araştırmada antibiyotik direnç profili ile moleküler yöntemlerle elde edilen epidemiyolojik veriler arası ilişki aramışlardır. Antibiyotik duyarlı grupta geniş bir klonal çeşitlilik tespit edilmiş olup, MDR olan izolatların epidemik yüksek riskli olarak isimlendirilen kümede sık görüldüğü belirtilmiştir[153]. Mevcut tez çalışmasındaki izolatlar karbapenem direncinin yanında diğer birçok antibiyotiğe dirençli olduğu için antibiyotik direnci ile epidemiyolojik değerlendirme arasında bir ilişki tespit edilememiştir.

Ülkemizde yapılan 18 KF tanılı çocuk hastadan izole edilen 118 *P. aeruginosa* izolatı ile yapılan çalışmada da mevcut çalışmaya benzer şekilde genomik çeşitlilik tespit edilmiştir. Çapraz bulaşmayı destekleyecek bulgulardan bahsedilmiştir. Ayrıca genotipik ve fenotipik özellikleri arasında bir ilişki bulunamamıştır[149]. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarına PFGE analizi yapılmıştır. *Acinetobacter*'in kümeleşme oranı %80 tespit edilmiştir. *P. aeruginosa'nın* kümeleşme oranı %53 olup bu tez çalışması ile paralellik göstermektedir[154]. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının nispeten yüksek rekombinasyon sıklığının, çok klonlu popülasyon yapısında önemli rol aldığını düşünen çalışmalar mevcuttur[155,156].

Genotip 31 içerisinde yer alan H23 ve H24 izolatlarının izole edildiği servis (cerrahi YBÜ), antibiyotik duyarlılık profili, tespit edilen direnç ve virülans genlerinin aynı olmasıyla birbirine tamamen benzediği görülmektedir. Ancak sadece iki izolat olması ve ortam tarama izolatlarının olmaması bulaş hakkında yorum yapılmasını engellemektedir.

En büyük kümelerden olan genotip 34'ü içeren izolatların dahiliye yoğun bakım ünitesinden izole edildiği görüldü. Bu üç izolatın direnç ve virülans geni taşımadığı dikkat çekmektedir.

Genotip 38 içerisinde yer alan iki izolat (H53, H55) pandemi döneminde Covid servisine dönüştürülen servislerden birinde (beyin cerrahi servisi) tespit edildi. Antibiyotik duyarlılıkları aynı ve tespit edilen direnç, virülans genleri çok benzer olmasına rağmen küme 31 içerisindeki izolatlar için bahsedilen kısıtlılıklardan dolayı epidemiyolojik bir yorum yapılamamaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada yer alan örneklerin alındığı hastaların klinik bilgilerine ulaşılamaması bu çalışmanın kısıtlılıklarından biri olduğunu düşündürmektedir. İzolat sayısının az olması direnç geni tespit etme oranını düşürmüş olabilir. Ayrıca taranan direnç geni sayısını arttırmak daha çok genin tespit edilmesini sağlayabilir. VITEK sonucuna göre kolistin direnci tespit edilmedi. Kolistin değerlendirmesi referans test olan sıvı mikrodilüsyon testi ile yapılıp öyle yorumlanmalıdır.

İzolatların tamamı karbapenem dirençli olan bu çalışmada antibiyotik direnç oranı literatürdeki çalışmalara göre yüksek bulundu. Kulak akıntı kültürü izolatlarının dirençli olduğu dikkat çekti.

Direnç genlerinin tespit oranı ülkemizdeki çalışmalarla uyumlu bulunup diğer ülkelere göre düşük oranda görülmüştür. Bu çalışmada tespit edilen virülans genlerinin ülkemiz ve dünya geneli sonuçlara göre düşük oranda olduğu görülmektedir. Bu bilgiler ışığında daha çok örnek ile ve daha çok gen bölgesi içeren çalışmalar yapılması önerilmektedir.

PFGE sonucunda bant profili tamamen aynı veya yakın ilişkili olan suşlar ile demografik veriler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

Hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinin hastanede kolayca yayılabildiği ve uygun korunma ve kontrol önemlerinin alınmaması durumunda uzun süre hastane ortamında kalabileceği vurgulanması gerektiği kanısına varıldı. Bakterilerin hastalar arası ve klinikler arası bulaşını kontrol etmek için, enfeksiyonların kaynağını tespit etmek ve önleyici stratejiler geliştirmek için moleküler epidemiyolojik çalışmalar önem arz etmektedir.

Karbapeneme dirençli bakterilerin enfeksiyon kontrolü açısından her kurum tarafından yakından takip edilmesi, hem antibiyotik direnci ile mücadele için akılcı antibiyotik kullanım politikalarına hem de enfeksiyon kontrol önlemlerine faydalı olacağı düşünülmektir.

7. KAYNAKLAR

1. Hilliam Y, Kaye S, Winstanley C. Pseudomonas aeruginosa and microbial keratitis. *J Med Microbiol*. 2020;69(1):3-13. doi:10.1099/jmm.0.001110
2. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
3. BIYIK İ, TANRIVERDİ ÇAYCI Y, ATIGAN EB, BIRINCI A. Identification of virulence resistance genes in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from blood samples. *J Biotechnol Strateg Heal Res*. Published online 2022. doi:10.34084/bshr.1090884
4. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, et al. Role of efflux pump and oprD porin expression in carbapenem resistance of pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12(1):1-8. doi:10.3855/jidc.9486
5. Elmouaden C, Laglaoui A, Ennanei L, Bakkali M, Abid M. Virulence genes and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(10):892-898. doi:10.3855/jidc.10675
6. Aksoy MD, Tuğrul HM. Investigation of Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains by Phenotypic and Genotypic Methods. *Flora J Infect Dis Clin Microbiol*. 2020;25(3):301-307. doi:10.5578/flora.68921
7. Vallabhaneni S, Huang JY, Grass JE, et al. Antimicrobial susceptibility profiles to predict the presence of carbapenemase genes among carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates. *J Clin Microbiol*. 2021;59(6). doi:10.1128/JCM.02874-20
8. El-Domany RA, Emara M, El-Magd MA, Moustafa WH, Abdeltwab NM. Emergence of Imipenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates from Egypt Coharboring VIM and IMP Carbapenemases. *Microb Drug Resist*. 2017;23(6):682-686. doi:10.1089/mdr.2016.0234
9. Bogiel T, Depka D, Rzepka M, Kwiecińska-Piróg J, Gospodarek-Komkowska E. Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the pseudomonas aeruginosa clinical strains. *Antibiotics*. 2021;10(3):1-14. doi:10.3390/antibiotics10030241
10. Procop GW, Churc DL, Hall GS, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology)*. 7th ed. (Başustaoğlu A, Us D, eds.). Hipokrat Yayınevi; 2017.
11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz,Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji*. 26th ed. (Yenenler OŞ (çeviri editörü), ed.). Nobel Tıp Kitabevi; 2014.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *MEDICAL MICROBIOLOGY*. 8th ed. Elsevier; 2016.
13. Levinson W. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*. 14th ed. (Şener B, Esen B (çeviri editörleri), eds.). Güneş Tıp Kitabevleri; 2018.
14. Ataei M. Candida albicans Quorum Sensing Mediyatörlerinin Pseudomonas aeruginosa üremesi üzerine in vitro etkileri. Published online 2019.
15. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610. doi:10.1128/CMR.00040-09
16. KAYA E. ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ İNHİBİTÖRLERİNİN BAZI

ANTİBİYOTİKLER İLE KOMBİNASYONLARININ PSEUDOMONAS AERUGİNOSA' YA KARŞI ANTİBAKTERİYEL VE ANTİVİRÜLANS ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI. Published online 2020.
17. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 10th ed. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2000.
18. Sánchez-diener I, Zamorano L, López-causapé C, et al. crossm High-Risk Clones , and Virulence in the. 2017;61(12):1-11.
19. Cornelissen CN, Fisher BD, Harvey RA. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. 3rd ed. (Harvey RA, ed.).; 2013.
20. SIRIKEN B, ÖZ V. Pseudomonas aeruginosa: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. *Gıda ve Yem Bilim Teknol Derg*. 2017;52(18):42-52. https://dergipark.org.tr/tr/pub/bursagida/issue/39981/475192
21. Woods DE. Comparative genomic analysis of Pseudomonas aeruginosa virulence. *Trends Microbiol*. 2004;12(10):437-439. doi:10.1016/j.tim.2004.08.003
22. Karatuna O, Yağcı A. Pseudomonas aeruginosa ' da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg (*. 2008;38(1):42-51.
23. Finlayson EA, Brown PD. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented Pseudomonas aeruginosa Comparación de la Resistencia Antibiótica y los Factores de Virulencia en las Pseudomonas aeruginosa Pigmentadas y no Pigmentadas. 2011;60(876).
24. King JD, Kocíncová D, Westman EL, Lam JS. Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. 2009;(5):261-312. doi:10.1177/1753425909106436
25. Jain S, Ohman DE. Role of an Alginate Lyase for Alginate Transport in Mucoid Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun*. 2005;73(10):6429-6436. doi:10.1128/IAI.73.10.6429-6436.2005
26. Blanco-cabra núria, paetzold B, ferrar T, et al. Characterization of different alginate lyases for dissolving Pseudomonas aeruginosa biofilms. doi:10.1038/s41598-020-66293-2
27. Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by Pseudomonas aeruginosa elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30871-30879. doi:10.1074/jbc.M400796200
28. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute P. aeruginosa pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol*. 1993;75(4):1661-1669. doi:10.1152/jappl.1993.75.4.1661
29. Maçin S. Pigmentli ve pigmentsiz pseudomonas aeruginosa suşlarinin virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşilaştirilmasi. Published online 2014.
30. Hassuna NA, Mandour SA, Mohamed ES. Virulence constitution of multi-drug-resistant pseudomonas aeruginosa in upper Egypt. *Infect Drug Resist*. 2020;13:587-595. doi:10.2147/IDR.S233694
31. Islamieh DI, Afshar D, Esmaeili D. *Effect of Satureja Khuzistanica Essential Oil (SKEO) Extract on Expression of LasA and LasB Genes in Pseudomonas Aeruginosa*. Vol 11.; 2019. http://ijm.tums.ac.ir
32. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. *Cystic Fibrosis and Pseudomonas Aeruginosa: The Host-Microbe Interface*.; 2019. http://cmr.asm.org/
33. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. Pseudomonas aeruginosa Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infect Immun*. 2004;72(7):4275-4278. doi:10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004
34. Bogiel T, Pra˙ Zy´nskazy´ Zy´nska M, Kwiecí Nska-Piróg J, Mikucka A, Gospodarek-Komkowska E. Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa

Strains-Distribution of the Essential Enzymatic Virulence Factors Genes. Published online 2020. doi:10.3390/antibiotics10010008
35. Soberón-Chávez G, González-Valdez A, Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M. Rhamnolipids produced by Pseudomonas: from molecular genetics to the market. *Microb Biotechnol*. Published online 2020. doi:10.1111/1751-7915.13700
36. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006;36(2):78-91. doi:10.1016/j.medmal.2005.10.007
37. Swietnicki W, Czarny A, Antkowiak L, et al. Identification of a potent inhibitor of type II secretion system from Pseudomonas aeruginosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;513(3):688-693. doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.055
38. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81(1):7-11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012
39. Cieplik F, García-Contreras R, Van Hoek ML, et al. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections. Published online 2020. doi:10.3389/fmicb.2019.02894
40. Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(6):778-786. doi:10.1111/1758-2229.12085
41. Donlan RM. *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. Vol 8.; 2002. http://www.microbelibrary.org/
42. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(2):107-113. doi:10.1078/1438-4221-00196
43. Taylor PK, Yeung ATY, Hancock REW. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol*. 2014;191:121-130. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.09.003
44. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44. doi:10.1016/j.drup.2019.07.002
45. Mihaiescu DE, Grumezescu AM, Balaure PC, Mogosanu DE, Traistaru V. Biointerface research in applied chemistry release profile. 2011;5837(March):191-195.
46. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2013;4(JAN):1-8. doi:10.3389/fmicb.2013.00422
47. Murphy TF. Pseudomonas aeruginosa in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(2):138-142. doi:10.1097/MCP.0b013e328321861a
48. Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes fliC, toxA and phzS are common among Pseudomonas aeruginosa isolates from diabetic foot infections. *Infect Dis (Auckl)*. 2018;50(4):273-279. doi:10.1080/23744235.2017.1393839
49. Estaji M, Tabasi M, Sadeghpour Heravi F, et al. Genotypic identification of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with urinary tract infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;65:23-28. doi:10.1016/j.cimid.2019.03.014
50. Kitagawa K, Shigemura K, Yamamichi F, et al. Bacteremia complicating urinary tract infection by Pseudomonas aeruginosa: Mortality risk factors. *Int J Urol*. 2019;26(3):358-362. doi:10.1111/iju.13872
51. Fukuda K, Ishida W, Fukushima A, Nishida T. Molecular Sciences Corneal

Fibroblasts as Sentinel Cells and Local Immune Modulators in Infectious Keratitis. doi:10.3390/ijms18091831
52. Dave A, Samarth A, Karolia R, et al. microorganisms Characterization of Ocular Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa from Non-Contact Lens Related Keratitis Patients from South India. doi:10.3390/microorganisms8020260
53. Babich T, Naucler P, Valik JK, et al. Risk factors for mortality among patients with Pseudomonas aeruginosa bacteraemia: a retrospective multicentre study. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(2):105847. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.11.004
54. Liu T, Zhang Y, Wan Q. Infection and Drug Resistance Dovepress Pseudomonas aeruginosa bacteremia among liver transplant recipients. Published online 2018. doi:10.2147/IDR.S180283
55. Sunumu O, Report C. Ektima Gangrenozum. :25-27.
56. Özdemir S, Görgülü O, Özdemir N, Sürmelioğlu Ö, Akba Y. Olgu Sunumu / Case Report Ektima Gangrenosumlu Psödomonas Sepsisinde görülen Fasial Sinir Paralizisi Fasial Nerve Paralysis in Pseudomonas Sepsis with Ecthma Gangrenosum. :4-8.
57. Ramireddy S, Gudipati S, Zervos M. Expect the Unexpected: A Rare Case of Pseudomonas aeruginosa Endocarditis. *IDCases*. 2020;21:e00787. doi:10.1016/j.idcr.2020.e00787
58. Bodey GP, Bolivar R, Therapeutics D. Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa Author (s): Gerald P . Bodey , Ricardo Bolivar , Victor Fainstein and Leena Jadeja Published by : Oxford University Press Stable URL : https://www.jstor.org/stable/4453009 Infections Caused by Pseudomonas aeru. 2019;5(2):279-313.
59. De Freitas LC. Global Prio. *Cad Pesqui*. 2013;43(148):348-365.
60. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoeconomics Outcomes Res*. 2010;10(4):441-451. doi:10.1586/erp.10.49
61. Livermore DM. *Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance*. Vol 8.; 1995. http://cmr.asm.org/
62. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. *Emergence of Antibiotic-Resistant Pseudomonas Aeruginosa: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents*. Vol 43.; 1999. http://aac.asm.org/
63. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
64. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, Yuan G, Darouiche RO. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: A randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *Lancet*. 2015;385(9981):1949-1956. doi:10.1016/S0140-6736(14)62220-0
65. Torres A, Zhong N, Pachl J, et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):285-295. doi:10.1016/S1473-3099(17)30747-8
66. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label,

multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(2):226-240. doi:10.1016/S1473-3099(20)30796-9
67. Motsch J, De Oliveira CUM, Stus V, et al. RESTORE-IMI 1: A Multicenter, Randomized, Doubleblind Trial Comparing Efficacy and Safety of Imipenem/Relebactam vs Colistin Plus Imipenem in Patients with Imipenem-nonsusceptible Bacterial Infections. *Clin Infect Dis*. 2020;70(9):1799-1808. doi:10.1093/cid/ciz530
68. Bellido F, Martin NL, Siehnel RJ, Hancock REW. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability. *J Bacteriol*. 1992;174(16):5196-5203. doi:10.1128/jb.174.16.5196-5203.1992
69. Kobilka B. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Bone*. 2012;23(1):1-7. doi:10.2165/11317030-000000000-00000.Efflux-Mediated
70. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):4062-4070. doi:10.1128/AAC.00148-07
71. Jalal S, Wretlind B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. *Microb Drug Resist*. 1998;4(4):257-261. doi:10.1089/mdr.1998.4.257
72. Program M, Sciences N. Detection of possible mutations in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with lung infection. Published online 2018.
73. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011;19(8):419-426. doi:10.1016/j.tim.2011.04.005
74. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):253-267. doi:10.1002/wsbm.1335
75. Walters Iii MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):317-323. doi:10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
76. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357-372. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306
77. Maisonneuve E, Gerdes K. Leading Edge Review Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. Published online 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.02.050
78. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*. 2017;131:185-195. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.022
79. Livermore DM. *Carbapenemases: A Problem in Waiting?*; 2000.
80. Sotello D, Chakkour W, Fuhrmann K. The Carbapenems Issue. *Southwest Respir Crit Care Chronicles*. 2018;6(25):5-7. doi:10.12746/swrccc.v6i25.476
81. Codjoe FS, Donkor ES. medical sciences Review Carbapenem Resistance: A Review. doi:10.3390/medsci6010001
82. Registry CAS, Molecular NO. Carbapenems. 2017;(Md).
83. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial

Infections. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S565-S575. doi:10.1093/cid/ciz830
84. Bush K. Past and present perspectives on β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18
85. Vrancianu CO, Gheorghe I, Dobre E-G, et al. Molecular Sciences Emerging Strategies to Combat β-Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. doi:10.3390/ijms21228527
86. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure-based classification of class A β-Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(1):29-57. doi:10.1128/CMR.00019-15
87. Toussaint KA, Gallagher JC. β-Lactam/β-Lactamase Inhibitor Combinations: From Then to Now. *Ann Pharmacother*. 2015;49(1):86-98. doi:10.1177/1060028014556652
88. Nebreda-Mayoral T, Miguel-Gómez MA, March-Rosselló GA, et al. Bacterial/fungal infection in hospitalized patients with COVID-19 in a tertiary hospital in the Community of Castilla y León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Published online 2021:1-13. doi:10.1016/j.eimc.2020.11.003
89. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in Enterobacteriaceae isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14(1):1-6. doi:10.1186/s12941-015-0105-1
90. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
91. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. 2019;431(18):3472-3500. doi:10.1016/J.JMB.2019.04.002
92. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11). doi:10.1128/JCM.01140-18
93. KILIÇ Ü, DEMİRAY T, ALTINDİŞ M. Phenotypic and Genotypic Methods for Determination of Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae Isolates. *Ankem Derg*. 2016;30(2):62-75. doi:10.5222/ankem.2016.062
94. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa-an emerging challenge. Published online 2022. doi:10.1080/22221751.2022.2048972
95. Zhong H, Wu ML, Feng WJ, Huang SF, Yang P. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;21:138-147. doi:10.1016/j.jgar.2019.10.010
96. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. doi:10.1093/jac/dkr563
97. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. Published online 2015. doi:10.1093/jac/dku571
98. Schäfer E, Malecki M, Tellez-Castillo CJ, et al. Molecular surveillance of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa at three medical centres in Cologne, Germany. doi:10.1186/s13756-019-0665-5
99. Jabalameli F, Taki E, Emaneini M, Beigverdi R. Prevalence of metallo-β-lactamase-encoding genes among carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Iran. *Rev Soc Bras Med Trop*. 51(3):270-276. doi:10.1590/0037-8682-0044-2018

100. Riley LW, Blanton RE. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field. *Microbiol Spectr*. 2018;6(6):1-12. doi:10.1128/microbiolspec.ame-0001-2018
101. Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: A how-to guide. *New Microbiol*. 2014;37(1):1-15.
102. Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*. 2019;74:103935. doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
103. Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Karam Sarkis D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods*. 2014;107:106-118. doi:10.1016/j.mimet.2014.09.009
104. Goering R V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):866-875. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.023
105. Maule J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol*. 1998;9(2):107-126. doi:10.1007/BF02760813
106. Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A. The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(1):DE01-DE04. doi:10.7860/JCDR/2016/15718.7043
107. Basim E, Basim HH. Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish J Biol*. 2001;25:405-418.
108. Blöcher D, Kunhi M. DNA double-Strand break analysis by CHEF electrophoresis. *Int J Radiat Biol*. 1990;58(1):23-34. doi:10.1080/09553009014551411
109. Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Çalişkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial Acinetobacter baumannii infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Infect Control*. 2009;37(1):56-64. doi:10.1016/j.ajic.2008.01.010
110. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-2239. doi:10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
111. T.C. Sağlık Bakanlığı, Başkanlığı THSK, Başkanlığı MRLD. *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ*.; 2014.
112. EUCAST. Puntos De Corte Numero 19Pg. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Testing Break tables Interpret MICs Zo diameters Version 120, 2022 http//www.eucast.org"*. 2011;12,0:1-110.
113. Coligan EC, Dunn B, Ploegh H, et al. Current Protocols in Protein Science Cell Adhesion and Human Disease Short Protocols Edition in Molecular Biology , Structure in Protein Chemistry. *Current*. 1996;340(l):1996-1996.
114. Jeon B, Jeon B, Jeong SH, et al. Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem-Resistant. *Society*. 2005;43(5):2241-2245. doi:10.1128/JCM.43.5.2241
115. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004
116. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3261-3265. doi:10.1128/JCM.02368-08

117. Cicek AC, Saral A, Iraz M, et al. OXA- and GES-type β-lactamases predominate in extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):410-415. doi:10.1111/1469-0691.12338
118. Access O. Killing Dynamics of Carbapenems against Pseudomonas aeruginosa Harboring Varied Determinants of Carbapenem Resistance. *Ann Clin Microbiol*. 2020;23(2). doi:10.5145/acm.2020.23.2.4
119. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
120. Kaszab E, Szoboszlay S, Dobolyi C, Háhn J, Pék N, Kriszt B. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from composts. *Bioresour Technol*. 2011;102(2):1543-1548. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.027
121. Sonbol FI, Khalil MAEF, Mohamed AB, Ali SS. Correlation between antibiotic resistance and virulence of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Turkish J Med Sci*. 2015;45(3):568-577. doi:10.3906/sag-1406-58
122. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2014;5(3):125-134.
123. Nasser M, Gayen S, Kharat AS. Prevalence of β-lactamase and antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa in the Arab region. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:152-160. doi:10.1016/j.jgar.2020.01.011
124. Gajdács M, Baráth Z, Kárpáti K, et al. No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa: Results from a laboratory-based in vitro study. *Antibiotics*. 2021;10(9):1-16. doi:10.3390/antibiotics10091134
125. Holbrook SYL, Garneau-Tsodikova S. Evaluation of aminoglycoside and carbapenem resistance in a collection of drug-resistant pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):1020-1030. doi:10.1089/mdr.2017.0101
126. Wang Y, Ma J, Li W, Liu M, Ding Y. Five-year Surveillance of Antimicrobial Resistance Changes and Epidemiological Characteristics in Pseudomonas aeruginosa: A Retrospective Study in a Chinese City Hospital. *Jundishapur J Microbiol*. 2021;14(11). doi:10.5812/JJM118107
127. Suşlarının Dört Yıllık Direnç Profili. Published online 2021:306-311.
128. ŞAFAK B, TOMBAK Ö, EREN TOPKAYA A. Kolistin Antimikrobiyal Duyarlılık Testinin Vıtek-2 Ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. *Namık Kemal Tıp Derg*. 2020;8(1):73-78. doi:10.37696/nkmj.581622
129. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413-431. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
130. Al-Khudhairy MK, Al-Shammari MMM. Prevalence of metallo-β-lactamase–producing Pseudomonas aeruginosa isolated from diabetic foot infections in Iraq. *New Microbes New Infect*. 2020;35:100661. doi:10.1016/j.nmni.2020.100661
131. Liew SM, Rajasekaram G, Puthucheary SD, Chua KH. Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;13:271-273. doi:10.1016/j.jgar.2018.01.026

132. Sabour S, Huang JY, Bhatnagar A, et al. Detection and characterization of targeted carbapenem-resistant health care-associated threats: Findings from the antibiotic resistance laboratory network, 2017 to 2019. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(12). doi:10.1128/AAC.01105-21
133. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksal I. Molecular epidemiology of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates carrying IMP-1 metallo-β-lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microb Drug Resist*. 2007;13(3):191-198. doi:10.1089/mdr.2007.748
134. Mansur A, Ay S, Otlu B, Güclüer N, Ersoy Y. Turgut özal Tip Merkezi Dergisi Karbapenem Dirençli Pseudomonas aeruginosa ¡ zolatlarmda Métallo Beta Laktamaz Üretiminin Ara § tinlmasi *. 2013;20(3):237-242.
135. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β-lactamases in Pseudomonas aeruginosa in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(3):292-294. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.003
136. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. Induction of the mexXY efflux pump in Pseudomonas aeruginosa is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol*. 2005;187(15):5341-5346. doi:10.1128/JB.187.15.5341-5346.2005
137. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81(2):127-132. doi:10.1016/j.jcma.2017.08.016
138. Nabilou M, Babaeekhou L, Ghane M. Fluoroquinolone resistance contributing mechanisms and genotypes of ciprofloxacin- unsusceptible Pseudomonas aeruginosa strains in Iran: emergence of isolates carrying qnr/aac(6)-Ib genes. *Int Microbiol*. 2022;25(3):405-415. doi:10.1007/s10123-021-00220-x
139. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):337-418. doi:10.1128/CMR.00117-14
140. Uzunbayır-Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, et al. The virulence characteristics and epidemiological relationship of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates. *Turkish Bull Hyg Exp Biol*. 2019;76(4):395-404. doi:10.5505/turkhijyen.2019.68235
141. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959-964. doi:10.1038/35023079
142. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*. 2018;8(1):31-40. doi:10.18683/germs.2018.1130
143. Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D, Jabalameli L, Hashemi M, Beigverdi R, Jabalameli F. Molecular analysis and antimicrobial resistance pattern of distinct strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients in Iran. *Iran J Microbiol*. 2019;11(2):98-107. doi:10.18502/ijm.v11i2.1068
144. Alonso B, Fernández-Barat L, Di Domenico EG, et al. Characterization of the virulence of Pseudomonas aeruginosa strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-8. doi:10.1186/s12879-020-05534-1
145. Elnegery AA, Mowafy WK, Zahra TA, Abou El-Khier NT. Study of quorum-sensing LasR and RhlR genes and their dependent virulence factors in Pseudomonas aeruginosa isolates from infected burn wounds. *Access Microbiol*. 2021;3(3):1-11.

doi:10.1099/acmi.0.000211
146. El-Mahdy R, El-Kannishy G. Virulence factors of carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa in hospital-acquired infections in Mansoura, Egypt. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3455-3461. doi:10.2147/IDR.S222329
147. Malaş İren H. Kan kültürlerinden izole edilen pseudomonas aeruginosa suşlarında biyofilm ve TİP-3 sekresyon sistemi arasindaki ilişkinin araştırılması. Published online 2022. doi:http://acikerisim.pau.edu.tr:8080/xmlui/handle/11499/45750
148. Pseudomonas aeruginosa Klinik İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması ve İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkinin Pulsed Field Jel Elektroforez Yöntemiyle Belirlenmesi Program Kodu : 3001 Proje No : 216S663 Proje Yürütücüsü : Dr . Öğr . Üyesi Ebru. Published online 2018.
149. Okur DS, Yuruyen C, Gungor O, et al. Genotypic characterization of Pseudomonas aeruginosa isolates from turkish children with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist*. 2019;12:675-685. doi:10.2147/IDR.S183151
150. Salimi H, Owlia P, Yakhchali B, Lari AR. Characterization of pseudomonas aeruginosa in burn patients using pcr restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic dna analysis. *Iran J Med Sci*. 2010;35(3):236-241.
151. Brzozowski M, Krukowska A, Galant K, Jursa-Kulesza J, Kosik-Bogacka D. Genotypic characterisation and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients of different hospitals and medical centres in Poland. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-9. doi:10.1186/s12879-020-05404-w
152. Lila G, Mulliqi G, Raka L, Kurti A, Bajrami R, Azizi E. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in University clinical center of Kosovo. *Infect Drug Resist*. 2018;11:2039-2046. doi:10.2147/IDR.S174940
153. Slekovec C, Robert J, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa isolated from infected ICU patients: a French multicenter 2012–2013 study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(5):921-926. doi:10.1007/s10096-019-03519-w
154. Ragbetli C, Güdücüoğlu H, Parlak M. Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edilen Çoklu İlaç Dirençli Acinetobacter and Pseudomonas İzolatlarında Karbapenem Direncinin Araştırılması. *J Contemp Med*. 2019;9(March 2016):275-279. doi:10.16899/jcm.609560
155. Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, et al. Population structure of Pseudomonas aeruginosa from five Mediterranean countries: Evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One*. 2011;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0025617
156. Kidd TJ, Ritchie SR, Ramsay KA, Grimwood K, Bell SC, Rainey PB. Pseudomonas aeruginosa Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0044199

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

K-Q TSE-ISO-EN 9000

Sayı : 40465587-050.01.04-217
Konu : Karar Yazısı

28.08.2020

Sayın Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz **"Karbapenem Duyarlı Olmayan Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının MLST ve PFGE İle Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi"**isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre **20.08.2020** tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş olup, **2020/181** karar numarası ile bilimsel ve etik yönden **uygun** bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Başkan

Tel :Fax :

Bilgi : BURAK HANKAYA

Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Kodu : F534C23A-991D-4008-83B6-06E3D9A6A8BC - http://ebys.erdogan.edu.tr/EBYS/eimzadogrulama

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Karbapenem Duyarlı Olmayan Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının MLST ve PFGE İle Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	212

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Dr.Hamiyet Büşra GÜNDOĞDU			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Osman Birol ÖZGÜMÜŞ			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Öğr.Gör.Nebahat EJDER			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI				
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI				
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI				
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı Soyadı: **Prof.Dr.Hüseyin Avni UYDU**
İmzası

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Karbapenem Duyarlı Olmayan Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının MLST ve PFGE İle Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	212

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK			
Değerlendirilen Belgeler	**Belge Adı**	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	**11.08.2020**	**212**	**Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐**
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			**Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐**
Karar Bilgileri	**Karar No: 2020/181**	**Tarih: 20.08.2020**		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna **"Oy birliği"** ile karar verilmiştir.			

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr.Hüseyin Avni UYDU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Hüseyin Avni UYDU (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet ALTUNTAŞ (Raportör)	Acil Tıp	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Atilla TOPÇU	Tıbbi Farmakoloji	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Özlem ÇELEBİ ERDİVANLI (Üye)	Kulak-Burun-Boğaz Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Oğuz KÖSE (Üye)	Periodontoloji	RTEÜ Diş Hek. Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	----------
Doç.Dr. Fatma BEYAZAL ÇELİKER (Üye)	Radyoloji	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	----------
Dr.Öğr.Üyesi Uğur KOSTAKOĞLU (Üye)	Enfeksiyon Has. Ve Klinik Mikr.	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Tahsin Gökhan TELATAR (Üye)	Halk Sağlığı	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Kader Semra KARATAŞ (Üye)	Ruh Sağlığı ve Hast.	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Şule BATÇIK (Üye)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Turgay AYDIN (Üye)	Çocuk Sağ. Ve Hast.	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Sabri ÇOLAK (Üye)	Kadın Hast. ve Doğum	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	----------
Dr.Öğr.Üyesi Nuray DEMİRCİ GÜNGÖRDÜ (Üye)	Tıp Tarihi ve Etik	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Gökhan ASLAN(Üye)	Göz Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

T.C
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FAKÜLTE YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	GÜNDEM-KARAR MADDESİ
18.08.2021	477	02

KARAR-02 Fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi **Arş. Gör. Dr. Hamiyet Büşra GÜNDOĞDU**'nun uzmanlık tez konusunun değiştirilmesi hususu ile ilgili Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığının 03.06.2021 tarihli akademik kurul kararı görüşüldü.

Fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi **Arş. Gör. Dr. Hamiyet Büşra GÜNDOĞDU**'nun uzmanlık tez konusunun "Karbapenem Dirençli P. Aeruginosa İzolatlarının Direnç ve Virülans Genlerinin Taranması ve PFGE ile Moleküler Epidomiyolojisinin İncelenmesi= Determination of the Resistance and Virulence Genes is Carbapenem Resistant P. Aeruginosa İsolates and İnvestigation of its Molecular Epidemiology by PFGE" olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

ASLININ AYNIDIR
18.08.2021
Yavuz Sultan CERRAH
Fakülte Sekreteri