

# Seftazidime Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Beta-Laktamazların Moleküler Epidemiyolojisi

## Molecular Epidemiology of Beta-Lactamases in Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Halil ER<sup>1</sup>, Mustafa ALTINDIŞ<sup>2</sup>, Gülşah AŞIK<sup>3</sup>, Cengiz DEMİR<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Muş Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Muş.

<sup>1</sup> Muş State Hospital, Microbiology Laboratory, Muş, Turkey.

<sup>2</sup> Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

<sup>2</sup> Sakarya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sakarya, Turkey.

<sup>3</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon.

<sup>3</sup> Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Afyon, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 17.09.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 08.11.2015

### ÖZ

*Pseudomonas aeruginosa*, özellikle immün sistemin baskılandığı hastalarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir. Bakterinin birçok antibiyotiğe karşı yüksek oranda direnç geliştirme özelliği, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının mortalite ve morbiditesini artırmaktadır. Bu çalışmada, yatan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA gibi direnç enzimlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2010-2012 yılları arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan 134'ü erkek 61'i kadın hastanın çeşitli klinik örneklerinden (29 balgam, 67 yara, 53 trakeal aspirat, 23 kan, 18 idrar, 3 beyin omurilik sıvısı, 2 pleural sıvı) izole edilen, 195 *P.aeruginosa* suşu dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel ve otomatize sistemler (VITEK 2, BioMerieux, Fransa) kullanılmış; antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon ve E-test yöntemleri uygulanmıştır. İzolatların indüklenbilir beta-laktamaz (İBL), genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimleri, fenotipik olarak, sırasıyla çift disk indüksiyon yöntemi, çift disk sinerji testi ve E-test yöntemi ile saptanmıştır. İzolatlarda direnç enzimlerini (PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA) kodlayan genlerin varlığı ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmış; pozitif örneklerde dizi analizi uygulanmıştır. Çalışmamızda, 195 *P.aeruginosa* suşunun tümü (%100) seftazidime, %90.8'i tazobaktam/piperasiline, %60.5'i aztroenama, %50.2'si sefepime, %48.2'si imipeneme, %47.2'si meropeneme, %47.2'si ofloksasine, %44.1'i pipe-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Halil Er, Muş Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Muş, Türkiye.

Tel (Phone): +90 505 515 2050, E-posta (E-mail): haliler004@hotmail.com

rasiline, %31.3'ü levofloksasine, %26.2'si siprofloksasine, %11.8'i gentamisine, %8.7'si amikasin ve %6.2'si tobramisine dirençli bulunmuştur. Fenotipik yöntemlerle, izolatların %89.2'sinde (174/195) İBL, %30.7'sinde (60/195) GSBL ve %26.7'sinde (52/195) MBL pozitifliği tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalar sonucunda beş izolatta OXA-10, dört izolatta OXA-14, dört izolatta VIM-2, iki izolatta IMP-1, 26 izolatta GES-1 ve 87 izolatta ABC taşıyıcı permeaz (transporter permease) geni saptanmış; PER ve KPC genlerine rastlanmamıştır. Sonuç olarak, beta-laktamaz genlerini taşıyan kökenlerin saptanması ve beta-laktamaz tiplerinin tanımlanmasının; antibiyotik seçiminde, tedavinin takibinde, direnç gelişiminin önlenmesinde ve enfeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Pseudomonas aeruginosa*; beta-laktamazlar; moleküler epidemiyoloji.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen that cause mainly nosocomial infections especially in the immunocompromised patients, the elderly and patients with severe burns. The bacterial feature of developing high degree of resistance against several antibiotics leads to increased morbidity and mortality of *P.aeruginosa* infections. The aims of this study were to investigate the antibiotic susceptibilities of *P.aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients and to determine the presence of resistance enzymes namely PER, GES, KPC, VIM, IMP and OXA. A total of 195 *P.aeruginosa* strains isolated from different clinical samples (29 sputum, 67 wound, 53 tracheal aspirate, 23 blood, 18 urine, 3 cerebrospinal fluid, 2 pleural fluid) of inpatients (134 male, 61 female) in Afyon Kocatepe University School of Medicine Hospital between 2010-2012, were included in the study. The isolates were identified by conventional methods and automated systems (VITEK 2, BioMerieux, France), and their antibiotic susceptibilities were detected by disk diffusion and E-test methods. Inducible beta-lactamase (IBL), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and metallo-beta-lactamase (MBL) productions of the isolates were phenotypically investigated by double disk induction, double disk synergy and E-test methods, respectively. The presence of resistance genes encoding PER, GES, KPC, VIM, IMP and OXA enzymes were determined by real-time polymerase chain reaction, and sequence analysis was applied to positive samples. In our study, the antibiotic resistance rates of 195 *P.aeruginosa* strains were found as follows: ceftazidime 100%, tazobactam/piperacillin 90.8%, aztreonam 60.5%, cefepime 50.2%, imipenem 48.2%, meropenem 47.2%, ofloxacin 47.2%, piperacillin 44.1%, levofloxacin 31.3%, ciprofloxacin 26.2%, gentamicin 11.8%, amikacin 8.7% and tobramycin 6.2%. With the use of phenotypical methods, IBL, ESBL and MBL production rates in the isolates were detected as 89.2% (174/195), 30.7% (60/195) and 26.7% (52/195), respectively. Molecular studies showed that, five strains harboured OXA-10, four OXA-14, four VIM-2, two IMP-1, 26 GES-1 and 87 ABC transporter permease genes, while PER and KPC genes were not detected in any of the isolates. In conclusion, it was considered that the detection of beta-lactamase genes in bacteria and the identification of beta-lactamase types may provide facilities in selection of antibiotics, monitorization of therapy, prevention of resistance development of infection control programs.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; beta-lactamases; molecular epidemiology.

## GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa*, konağın deri savunmasının tahrip olduğu geniş yanığı olan, kistik fibrozis gibi solunum yolu hastalığı olan ve katater uygulaması yapılan hastalar ile bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda ciddi enfeksiyonlara neden olan bir patojendir<sup>1</sup>. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi penisilinler; seftazidim, sefoperazon ve sefepim gibi sefalosporinler; imipenem, meropenem

ve doripenem gibi karbapenemler; aztreonam gibi monobaktam; amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi aminoglikozidler; tetrasiklin, minosiklin ve doksisisiklin gibi uzun etkili tetrasiklinler; siprofloksasin ve levofloksasin gibi florokinolonlar kullanılmaktadır<sup>1</sup>.

Beta-laktam antibiyotikler, gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ilaçların başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta-laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir<sup>2</sup>. Beta-laktamazlar, beta-laktam grubu antibiyotiklerde bulunan beta-laktam halkasının amid bağlarına etki ederek bu bağları parçalarlar. Beta-laktamazlar, plazmid veya kromozomal kökenli bakteriyel enzimler olup, bakteride beta-laktamaz sentezi yapısal veya indüklenebilir düzeyde olabilir. Gram-negatif bakterilerde periplazmik alanda bulunan enzim, gram-pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır<sup>2</sup>. Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatmakta olan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespit edilmesi, beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA gibi direnç enzimlerinin saptanması, enzim taşıdığı belirlenen izolatların dizi analizlerinin yapılması ve alt türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2010-2012 yılları arasında hastanemizde yatan 134'ü erkek 61'i kadın hastanın çeşitli klinik örneklerinden (29 balgam, 67 yara, 53 trakeal aspirat, 23 kan, 18 idrar, 3 BOS, 2 plevral sıvı) izole edilen 195 *P.aeruginosa* suşu dahil edildi. Örneklerin 50'si cerrahi birimler, 33'ü anestezi yoğun bakım, 33'ü dahiliye, 29'u göğüs hastalıkları, 16'sı ortopedi, 15'i enfeksiyon hastalıkları, 13'ü nöroloji ve 6'sı pediatri servislerinden gönderilmişti.

### Suşların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistem (VITEK 2, BioMerieux, Fransa) kullanıldı. Tanımlanan suşlar antibiyogram ve moleküler çalışmalar yapıncaya kadar saklama besiyerinde (Cryo-Billes, AES Chemunex, Fransa) -80°C'de saklandı.

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon (DD) ve E-test yöntemleri kullanıldı. DD yönteminde; seftazidim (30 µg), gentamisin (10 µg), tobramisin (10 µg), piperasilin (100 µg), amikasin (30 µg), aztreonam (30 µg), sefepim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tazobaktam/piperasilin (110 µg) ve ofloksasin (5 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Ayrıca imipenem duyarlılığı E-test (Liofilchem, İtalya) ile araştırıldı. CLSI kriterleri doğrultusunda, antibiyogram diskleri ve E-test kalite kontrolleri *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu ile yapıldı; hasta örnekleri CLSI kriterlerine göre değerlendirildi<sup>3</sup>.

### Çift Disk İndüksiyon Yöntemi

Bu yöntem, indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) varlığının saptanmasında kullanıldı. Bu amaçla Mueller-Hinton agar (MHA) yüzeyine 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri

süspansiyonu inoküle edildi ve sonra plak üzerine güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisi olarak imipenem diski ile bunun 20 mm uzağına seftazidim diski yerleştirildi. Seftazidimin indükleyici olan imipeneme bakan yüzünde, inhibisyon zonunun belirgin olarak daralması İBL pozitifliği olarak kabul edildi.

### Çift Disk Sinerji Testi

Bu yöntem, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının saptanmasında kullanıldı. İzolatların 24 saatlik taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA plağına yayıldıktan sonra petrinin ortasına amoksisilin/klavulanik asit (AMC) (20/10 µg), etrafına disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve sefepim (30 µg) diskleri yerleştirildi. 37°C'de 16-18 saat inkübasyon sonrası, sefalosporin veya aztreonam arasındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya diğer antibiyotik diskleri arasında bakterin üremediği bir sinerji alanı oluşturması GSBL pozitif olarak kabul edildi.

### E-Test Yöntemi

Bu yöntem, metallo-beta-laktamaz (MBL)'ların fenotipik olarak saptanmasında kullanıldı. İzolatların taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA üzerine homojen olarak inoküle edildi. Besiyeri yüzeyinin kurumasının ardından E-test şeridi besiyeri üzerine yerleştirildi ve plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İmipenem + EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az 8 kat azalma saptanması, MBL enzimi açısından pozitif kabul edildi. Testin pozitif olmasının diğer bir kriteri olarak; E-test şeridinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde hayalet bölge (ghost zone) olarak adlandırılan görünümün varlığı dikkate alındı<sup>4</sup>.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu yöntem, direnç enzimlerini (PER, OXA, IMP, VIM, KPC, GES) kodlayan gen bölgelerinin saptanmasında kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, dondurularak saklanmış olan izolatlar koyun kanlı agar (KKA) besiyerine pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Her bakteri suşu için, steril ependorf tüplere 100 µl TrisEDTA (1X) koyularak, steril öze ile her petriden 2-3 koloni alınıp lizis tamponu içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Kaynamış 100°C'lik saf suda 15 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında soğuması için beklendi ve sonra tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası bakteri DNA'larının bulunduğu süpernatanın 30 µl'si alınıp PCR işlemi için ayrıldı.

Elde edilen DNA'lara iki aşamalı PCR uygulandı. Birinci aşamada, primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için in-house PCR (Techne TC-512 Thermal Cycler, ABD) ile optimizasyon çalışmaları yapıldı; ikinci aşamada ise gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) (Stratagene Mx3005 Multiplex Quantitative PCR System, Almanya) uygulandı.

Öncelikle konvansiyonel olarak tanımlanan bakterilerin moleküler olarak doğrulanması için *P.aeruginosa* 23S RNA gen bölgesi çoğaltıldı. Doğrulanmış izolatların DNA'ları PER,

OXA, IMP, VIM, KPC ve GES gen bölgelerinin gösterilmesi için 6 ayrı primer seti kullanılarak PCR işlemine tabi tutuldu (Tablo I)<sup>5-11</sup>. Amplikasyon protokolü; 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyon, 95°C'de 30 saniye, 54°C'de 30 saniye, 72°C'de 20 saniye olmak üzere 30 döngü ve 72°C'de 5 dakika son çoğaltma şeklinde uygulandı. PCR sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforez yöntemiyle incelendi.

## Dizi Analizi

PCR reaksiyonları sonucu oluşan PER, OXA, IMP, VIM, KPC ve GES gen bölgelerinin dizi analizi için amplikonlar MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) Blast programı<sup>12</sup> kullanılarak veri bankasıyla karşılaştırıldı ve amplikonların hangi genle homolog olduğu belirlenerek çoğaltılan amplikonlar doğrulandı.

## BULGULAR

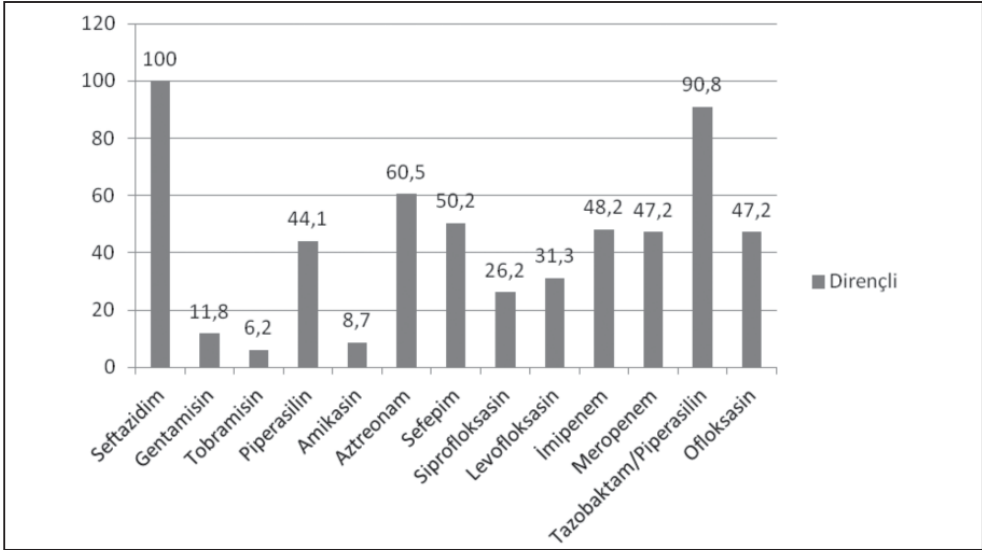
Çalışmamızda, seftazidime dirençli 195 *P.aeruginosa* izolatında en yüksek direnç oranı tazobaktam/piperasiline (%90.8), en düşük direnç oranı ise tobramisine (%6.2) karşı saptanmış; izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Şekil 1'de gösterilmiştir. Suşların 49'unun (%25.1) çoklu ilaç direncine sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan E-test sonuçlarına göre, imipenem MİK değeri  $\geq 4$  µg/ml olan 95 suş tespit edilmiştir.

Çift disk sinerji yöntemi ile taranan 195 örneğin 60'ında (%30.7) GSBL pozitifliği, çift disk indüksiyon yöntemi ile 174'ünde (%89.2) indüklenebilir beta-laktamaz saptanmış olup, E-test yöntemi ile 52 suşta (%26.7) MBL enzimi fenotipik olarak belirlenmiştir.

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Amplikon boyutu (bç)	Primer baz dizisi (5'→3')	Kaynak no.
23S rRNA	831	F CGG AGG AGG CTA GGG CCG R GAC CGC CCC AGT CAA ACT GCC	5
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	775	F TAT CGC GTG TCT TTC GAG TA R TTA GCC ACC AAT GAT GCC C	6
<i>bla</i> <sub>PER</sub>	925	F ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC R AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA	7
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	371	F GTT TTG CAA TGT GCT CAA CG R TGC CAT AGC AAT AGG CGT AG	8
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	380	F GTG TTT GGT CGC ATA TCG C R CGC AGC ACC AGG ATA GAA G	9
<i>bla</i> <sub>MP</sub>	188	F GAA TAG AGT GGC TTA ATT CTC R CCA AAC CAC TAC GTT ATC	10
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	503	F CGC CGT GCA ATA CAG TGA TA R CGT TGA CGC CCA ATC C	11

F: Forward; R: Reverse; bç: Baz çifti.



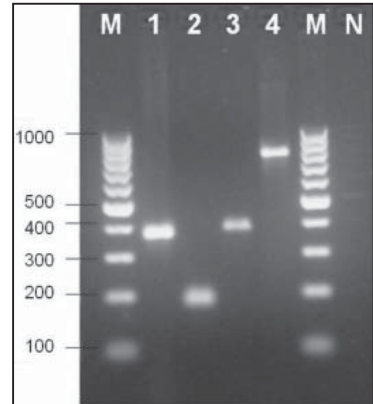
Şekil 1. *P.aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnç oranları (n= 195)

PCR sonuçlarına göre; 195 suşun 113'ünde (%57.9) GES, 9'unda (%4.6) OXA, 4'ünde (%2) VIM, 2'sinde (%1) IMP direnç gen bölgesinin varlığı belirlenmiş; hiçbir suşta PER ve KPC geni saptanmamıştır (Şekil 2). PCR ile VIM ve IMP geni taşıdığı tespit edilen 6 örneğin tamamının imipenem MİK değeri  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır. Ayrıca bu suşların hepsinin E-test ile fenotipik olarak MBL ürettiği saptanmıştır.

Dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde; OXA geni saptanan 9 izolatın 5'i OXA-10, 4'ü OXA-14; VIM geni saptanan 4 izolatın hepsi VIM-2; IMP geni saptanan 2 izolatın hepsi IMP-1 olarak tanımlanmıştır. GES primerleri kullanılarak direnç genleri saptanan ve bu gen bölgelerine dizi analizi uygulanan 113 izolatın 26'sı GES-1 olarak tespit edilmiş, diğer 87 izolatta aynı primerle saptanabilen ve dizi analizi sonucu ayrımı yapılabilen ABC taşıyıcı permeaz (transporter permease) gen bölgesi tanımlanmıştır.

## TARTIŞMA

*P.aeruginosa* özellikle immün sistemin zayıfladığı veya baskılandığı hastalarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir<sup>1</sup>. Çeşitli antibiyotiklere yüksek oranda dirençli olması nedeniyle *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının mortalite ve morbiditesi yüksektir.



Şekil 2. Direnç genlerinin jel elektroforez görüntüsü (M: DNA belirteci (Vivantis DNA Ladder 100 bp, ABD); 1: GES pozitif izolat; 2: IMP pozitif izolat; 3: VIM pozitif izolat; 4: OXA pozitif izolat; N: Negatif kontrol)

İran'da 2013 yılında bir yanık ünitesinde yatan 182 hastanın 86'sında üretilen *P.aeruginosa* izolatlarının sefazolin (CFZ), piperasilin (PIP), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), tobramisin (TOB), amikasin (AMK), gentamisin (GEN) ve imipenem (IPM) direnç oranları sırasıyla; %83.7, %69.9, %68.8, %66.3, %58.2, %48.8, %37.2 ve %23.3 olarak bildirilmiştir<sup>13</sup>. Brezilya'da yapılan bir çalışmada ise, yatan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında direnç oranları AMK, GEN, CIP, aztreonam (ATM), sefepim (FEP), CAZ, IPM ve meropenem (MEM) için sırasıyla; %34, %41, %41, %29, %34, %32, %32 ve %37 olarak bulunmuştur<sup>14</sup>. Özyurt ve arkadaşları<sup>15</sup> 2010 yılında İstanbul bölgesinde yaptıkları çalışmada, AMK, GEN, levofloksasin (LVX), CIP, CAZ, FEP, ATM, IPM ve MEM'e sırasıyla; %17.6, %44.9, %21.2, %20, %64.3, %45.1, %60.3, %22.9 ve %18.9 oranlarında direnç saptamışlardır. İzmir bölgesinde ise 2011-2012 yıllarında anestezi yoğun bakım hastalarından izole edilen 51 *P.aeruginosa* suşunun CAZ, FEP, IPM, MEM, AMK ve GEN direnci sırasıyla; %76.5, %94.2, %88.3, %82.4, %88.3 ve %94.2 olarak bildirilmiştir<sup>16</sup>. Çalışmamız yukarıdaki çalışmalar ile karşılaştırıldığında; FEP, CAZ, ATM, tazobaktam/piperasilin (TZP) ve IPM'e karşı daha yüksek oranda direnç saptanmış, AMK, GEN ve CIP'e ise düşük oranda direnç belirlenmiştir (Şekil 1). Bu farklılığın nedenlerinin, bölgesel ve toplumsal farklılıklar, çalışılan hasta grupları, hastanelerin uyguladığı enfeksiyon kontrol önlemleri, ampirik tedavi tercihleri, hasta uyumu ve ilaç kullanım politikalarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Ülkemizde Yücel ve arkadaşlarının<sup>17</sup>, 2003, 2004 ve 2005 yılları arasındaki antibiyotik direnç değişimini inceledikleri bir çalışmada; CAZ direncinde %29'dan %50'ye, FEP'de %30'dan %44'e, ATM'de %3'den %45'e, TZP'de %25'ten %39'a ve CIP'de %22'den %39'a varan artış bildirilmiştir. Tunçoğlu ve arkadaşlarının<sup>18</sup> 179 suş ile yaptığı 2005-2006 ve 2007-2008 yılları arasındaki direnç artışını incelediği çalışmalarında; FEP direncinin %29'dan %48'e, CAZ direncinin %12'den %32'ye, ATM direncinin %27'den %60'a, IPM direncinin %0'dan %15'e ve MEM direncinin %2'den %15'e çıktığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde IPM, MEM, ATM, CIP, LVX ve ofloksasin (OFX) direnç oranlarında yıllara göre bir artışın söz konusu olduğu saptanmıştır (Tablo II).

Wolska ve arkadaşları<sup>19,20</sup> *P.aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) pozitiflik oranını 2001 yılında %72 oranında saptarken, 2008 yılında bu oranı %98.5 olarak tespit etmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da; Ekşi ve arkadaşları<sup>21</sup> 2007 yılında 51 *P.aeruginosa* suşunun %52'sinde, Özyurt ve arkadaşları<sup>15</sup> 2010 yılında 350 izolatın %62'sinde, Berktaş ve arkadaşları<sup>22</sup> da 2011 yılında 87 suşun %74'ünde İBL pozitifliği bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda saptanan İBL pozitiflik oranı (174/195; %89.2) ise ülkemizden bildirilen oranlara göre oldukça yüksektir. Bu durumun, bölgesel farklılıklar, hasta popülasyonundaki farklılıklar ve hastane florasında bulunan bakterilerin direnç paternlerinin farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Walsh ve arkadaşları<sup>4</sup> yaptıkları bir çalışmada, daha önce metallo-beta-laktamaz (MBL) ürettiği saptanan ve IPM MİK değeri 4 µg/ml olan izolatların büyük çoğunluğunun E-test ile pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, fenotipik olarak MBL tayininde E-testin duyarlılığını %94, özgüllüğünü %95 olarak vermişlerdir<sup>4</sup>. Buna karşın Toleman ve arkadaşları<sup>23</sup> E-test ile pozitif bulunan *P.aeruginosa* izolatlarından %80.6'sını (25/31), Sader ve arkadaşları<sup>24</sup> ise sadece %46.3'ünü (25/54) PCR ile MBL açısından doğrulayabil-



**Tablo II. Antibiyotik Direncinin Yıllara Göre Dağılımı**

	2010 (n= 30)	2011 (n= 77)	2012 (n= 88)	Toplam (n= 195)
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Seftazidim	30 (100)	77 (100)	88 (100)	195 (100)
Gentamisin	1 (3.3)	8 (10.4)	14 (15.9)	23 (11.8)
Tobramisin	1 (3.3)	2 (2.6)	9 (10.2)	12 (6.2)
Piperasilin	13 (43.3)	28 (36.4)	45 (51.1)	86 (44.1)
Amikasin	2 (6.7)	9 (11.7)	6 (6.8)	17 (8.7)
Aztreonam	17 (56.7)	40 (51.9)	61 (69.3)	118 (60.5)
Sefepim	14 (46.7)	38 (49.5)	46 (52.3)	98 (50.2)
Siprofloksasin	3 (10)	13 (16.9)	35 (39.8)	51 (26.2)
Levofloksasin	5 (16.7)	17 (22.1)	39 (44.3)	61 (31.3)
İmipenem	12 (40)	25 (32.5)	57 (64.8)	94 (48.2)
Meropenem	14 (46.7)	26 (33.8)	52 (59.1)	92 (47.2)
Tazobaktam/ piperasilin	30 (100)	64 (83.1)	83 (94.3)	177 (90.8)
Ofloksasin	11 (36.6)	21 (27.3)	60 (68.2)	92 (47.2)

mişlerdir. Rizek ve arkadaşları<sup>25</sup>, 1998-2012 yılları arasında hastanede yatan hastalardan izole ettikleri karbapeneme dirençli 129 *P.aeruginosa* izolatının 33'ünde SPM-1, dördünde VIM-2 ve üçünde GES-3 gen bölgesi tespit etmişlerdir. Bunun dışında dokuz suşta SPM-1 ve KPC-2 birlikteliği, bir suşta da SPM-1, VIM-2 ve KPC-2 gen birlikteliği saptamışlardır<sup>25</sup>. Ankara'da Çakar'ın<sup>26</sup> 2005 yılında 110 *P.aeruginosa* suşu ile yaptığı çalışmada, 25 suşta E-test ile MBL üretimi tespit edilmiş ve bu örneklerin 11'inde VIM direnç geni moleküler olarak gösterilmiştir. İzmir bölgesinde 2009 yılında yapılan çalışmada da, 80 *P.aeruginosa* suşunun 27'sinin fenotipik olarak MBL ürettiği bulunmuş, moleküler yöntemlerle bunlardan yedisinde VIM, birinde IMP gen varlığı saptanmıştır<sup>27</sup>. Çalışmamızda, VIM ve IMP gen bölgelerine ait iki adet konsensus primer seti kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 195 *P.aeruginosa* izolatının 52'sinde E-test ile MBL üretimi saptanmış, PCR ile dört izolatta VIM geni, iki izolatta ise IMP geni gösterilmiştir. Bu izolatların dizi analizleri sonuçlarına göre bunların VIM-2 ve IMP-1 oldukları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde saptanan sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Fransa'da 2001-2002 yılları arasında dokuz hastanenin katılımıyla gerçekleştirilen çalışmada, seftazidime dirençli 5.304 *P.aeruginosa* izolatından 37'sinde (%0.7) PER-1 geni varlığı tespit edilmiştir<sup>28</sup>. İstanbul'da 2007 yılında yapılan bir çalışmada, seftazidime dirençli (CAZ-R) 50 *P.aeruginosa* suşunun 22'sinde; Samsun'da 2008 yılında yapılan bir araştırmada da CAZ-R 50 *P.aeruginosa* izolatının 23'ünde PER-1 enzimi saptanmıştır<sup>29,30</sup>. Bizim çalışmamızda 56 örnekte GSBL saptanmasına rağmen PER-1 direnç geni bulunmamıştır.



İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yapılan çalışmada, 50 CAZ-R *P.aeruginosa* suşunun 23'ünde (%46) OXA-10 türevi enzimler saptanmıştır<sup>29</sup>. OXA türevleri, GSBL tipi OXA enzimlerini genel olarak içerdiği için, çalışmamızda OXA gen bölgesine yönelik ortak primer kullanılmış ve dokuz izolatta OXA türevi GSBL enzimi pozitif olarak bulunmuştur. Dizi analizleri yapılan izolatların beşi OXA-10, dördü OXA-14 olarak tanımlanmıştır.

İstanbul'da 2007 yılında Çelik'in<sup>29</sup> yaptığı çalışmada, 50 CAZ-R *P.aeruginosa* suşunun 43'ünde GES enzimi pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, izolatların %57.9'unda (113/195) GES pozitifliği saptanmış; ancak dizi analizi sonucunda 113 izolatın 26'sının GES-1 GSBL geni, 87 izolatın ise aynı primer dizileri ile saptanan ABC taşıyıcı permeaz geni taşıdığı gösterilmiştir. Bu proteinin siderofor özellik gösteren pigment üretiminden sorumlu olduğu, dışa atım pompa sistemi aracılığıyla antibiyotik direncine neden olabileceği ve bakterinin virülans faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir<sup>31</sup>. Tüm bu veriler GES enzimlerinin ülkemizde de yaygın olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu konu ile ilgili daha detaylı ileri çalışmalar yapılması, daha net sonuçlar alınmasına olanak sağlayabilecektir. Sonuç olarak, beta-laktamaz genlerini taşıyan kökenlerin saptanması ve beta-laktamazların tiplendirilmesinin; tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde, tedavinin takibinde, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve enfeksiyon kontrol programlarının geliştirilmesinde yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Vahapoğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, s: 2175-86. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
2. Ayaz C. Beta-laktamazların genel özellikleri ve penisilinler, s: 266-78. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second Informational Supplement, M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
4. Walsh T, Bolmström A, Qvarnström A, Gales A. Evaluation of a new E-test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2755-9.
5. Toschka HY, Hopfl P, Ludwig W, Schleifer KH, Ulbrich N, Erdmann VA. Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res 1987; 15(17): 7182.
6. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. FEMS Microbiol Lett 2005; 242(2): 319-24.
7. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(8): 2385-92.
8. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1): 396-401.
9. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, et al. Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, in95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2943-6.
10. Koh TH, Wang GC, Sng LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 5378-80.
11. Goldfarb D, Harvey S, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. J Clin Microbiol 2009; 47(6):1920-2.

12. National Center for Biotechnology Information. BLAST. Available at: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)
13. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol* 2013; 5(1):36-41.
14. Araújo Jácome PRL, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(6): 707-12.
15. Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baylan O, Hoşbul T, Ardiç N, Bektöre B. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2010; 24(3): 124-9.
16. Ece G, Samlioglu P, Atalay S, Kose S. Evaluation of the in vitro colistin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care centre in Western Turkey. *Infez Med* 2014; 22(1): 36-40.
17. Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öztürk C, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi. *ANKEM Derg* 2006; 20(3): 152-5.
18. Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2009; 23(2): 54-8.
19. Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A. Occurrence of beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. *Med Dosw Mikrobiol* 2001; 53(1): 45-51.
20. Wolska K, Jakubczak A, Soszynska A. Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL, IBL and MBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Med Dosw Mikrobiol* 2008; 60(2): 111-9.
21. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37(3):142-6.
22. Berkaş M, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Yaman G. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi. *Fırat Tıp Derg* 2011; 16(3): 125-8.
23. Toleman M, Biedenbach D, Bennett D, Jones R, Walsh T. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(1): 61-70.
24. Sader HS, Castanheira M, Mendes R, Toleman M, Walsh T, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(1): 57-61.
25. Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 43.
26. Çakar A. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. Doktora Tezi, 2005. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
27. Bozçal E. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının metallo-beta-laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanması. Yüksek Lisans Tezi, 2009. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
28. De Champs C, Chanal C, Sirot D, et al. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(3): 634-9.
29. Çelik N. Çoğul dirençli nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta-laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, 2007. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
30. Ünlü Söğüt M. Cefotaxim dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 ve OXA-10 benzeri beta-laktamazların moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi. 2008. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
31. Hunter RC, Newman DK. A putative ABC transporter, hatABCDE, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2010; 192(22): 5962-71.