Özgün Araştırma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2024;58(4):393-407*/doi: 10.5578/mb.20249666

Geliş Tarihi (Received): 25.04.2024 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.07.2024

Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Direncinde Resistance Nodulation Division (RND) Dışa Atım Pompası ve OPRD Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Investigation of Resistance Nodulation Division (RND) Efflux Pump and OPRD Expression Levels in Antibiotic Resistance of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Muhammed Furkan KÜRKÇÜ[1](ID), Tuğba FATSA[2](ID), Elif Seren TANRIVERDİ[3](ID), Hasan KARAKUŞ[4](ID), Tuğrul HOŞBUL[4](ID), Barış OTLU[5](ID)

[1] Ankara Etlik Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.
[1] *Ankara Etlik City Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.*

[2] Sağlık Bilimleri Ünivesitesi, ARGE Laboratuvarı Moleküler Uygulama ve Araştırma Birimi, Ankara.
[2] *University of Health Sciences, Laboratory of ARGE, Moleculer Training and Research Unit, Ankara, Türkiye.*

[3] Malatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Birimi, Malatya.
[3] *Malatya Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory Unit, Malatya, Türkiye.*

[4] Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
[4] *University of Health Sciences, Gülhane Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.*

[5] İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
[5] *İnönü University Faculty of Medicine, Deparment of Medical Microbiology, Malatya, Türkiye.*

* *Bu çalışma, XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur.*

* *Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2021-155).*

Makale Atıfı: *Kürkçü MF, Fatsa T, Tanrıverdi ES, Karakuş H, Hoşbul T, Otlu B. Klinik Pseudomonas aeruginosa izolatlarının antibiyotik direncinde resistance nodulation division (RND) dışa atım pompası ve OPRD ekspresyon düzeylerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(4):393-407.*

ÖZ

Toplum kökenli ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu olan *Pseudomonas aeruginosa*'da artan antibiyotik direnci küresel önem taşımaktadır. Dışa atım pompalarının aktivite artışı, dış membran porin geçirgenliğinin azalması ve karbapenemaz üretimi *P.aeruginosa*'da direnç gelişiminde rol oynayan en önemli mekanizmalardır. Bu çalışmada, *P.aeruginosa* izolatlarında resistance nodulation division (RND) dışa atım pompalarının, outer membrane porin D (OprD) dış membran proteininin ve karbapenemaz üretiminin farklı antibiyotiklere karşı direnç gelişimindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2019-2021 yılları arasında hastanemiz klinik örneklerinden izole edilmiş 80 *P.aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] kriterlerine göre VITEK® 2 (bioMérieux, Fransa) sistemiyle belirlenmiştir. Dış membran porin proteini OprD ile dışa atım pompalarının düzenleyici genleri olan *mex*B, *mex*C, *mex*E

İletişim (Correspondence): *Uzm. Dr. Muhammed Furkan Kürkçü, Ankara Etlik Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (554) 021 8201,*
E-posta (E-mail): *furkan.kurkcu@gmail.com*

ve *mex*X ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Rt-qPCR)] ile araştırılmıştır. *rps*L geni referans gen, *P.aeruginosa* PAO1 suşu kontrol suş olarak Rt-qPCR çalışmalarında kullanılmış ve karşılaştırmalı ekspresyon analizi delta-delta cycle threshold (ΔΔCt) yöntemiyle hesaplanmıştır. Çalışmada bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} ve bla_{OXA-10} varlığı PCR ile araştırılmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişki M13 primeri kullanılarak AP-PCR ile belirlenmiştir. Bant profilleri GelCompar II (Applied Maths) yazılım sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. İzolatlarının %63.7'sinde, karbapenem dirençli izolatların ise %74'ünde OprD ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. OprD için ekspresyon düzeyindeki azalma yalnızca karbapenem duyarlı (n= 30) ve karbapenem dirençli (n= 50) gruplar arasında anlamlı bulunmuştur (p= 0.014). *mex*B aşırı ekspresyon oranı karbapenem dirençli izolatlarda %82, karbapenem duyarlılarda %33; çok ilaca dirençli (ÇİD) izolatlarda %76.6, ÇİD olmayanlarda ise %45.5 olarak bulunmuştur (sırasıyla p= 0.001; p= 0.004). *mex*X aşırı ekspresyon oranı amikasine dirençli ve duyarlı grupta sırasıyla, %68 ve %40; gentamisine dirençli ve duyarlı grupta ise %64.3 ve %40.4 olarak bulunmuştur (sırasıyla, p= 0.02; p= 0.041). Çok ilaca dirençli izolatların %61.7'si, ÇİD olmayanların ise %30.3'ünde *mex*X aşırı ekpresyonu bulunmuştur (p= 0.006). *mex*C ve *mex*E ekspresyonu için antibiyotiklere duyarlı ve dirençli gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Karbapenem dirençli izolatların %32 (16/50)'sinde bla_{OXA-10} saptanırken, hiçbir izolatta bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} varlığı saptanmamıştır. AP-PCR analizinde, 64 farklı genotip saptanmış ve baskın bir genotip izlenmemiştir. İzolatların 14 farklı küme içinde gruplandığı ve kümeleşme oranının %36 olduğu bulunmuştur. *P.aeruginosa*'da özellikle RND dışa atım sistemlerinin antibiyotik direnç gelişiminde önemli rolü bulunmaktadır. Bu çalışma, *mex*B aşırı ekspresyonu ve OprD ekspresyonunda azalmanın karbapenem direnci gelişiminde; *mex*X aşırı ekspresyonunun ise amikasin ve gentamisine direnç gelişiminde rolü olduğunu göstermiştir. *mex*B ve *mex*X aşırı ekspresyonunun ÇİD izolatlar ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu bulunmuştur. İzolatların 16'sında bla_{OXA-10} varlığı saptanmış ve bu direnç geni varlığının karbapenem direnç gelişiminde katkısı olabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa; Rt-qPCR; dış membran proteini; karbapenem; gen ekspresyonu.*

ABSTRACT

The increasing antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, responsible for both community-acquired and hospital-acquired infections, is of global significance. The primary mechanisms contributing to resistance development in *P.aeruginosa* include the increased activity of efflux pumps, decreased permeability of outer membrane porins and the production of carbapenemases. This study aimed to determine the effects of resistance nodulation division (RND) efflux pumps, outer membrane porin D (OprD) outer membrane protein and carbapenemase production on the development of resistance to different antibiotics in *P.aeruginosa* isolates. Eighty *P.aeruginosa* isolates obtained from clinical samples in our hospital between 2019 and 2021 were included in the study. Species-level identification of the isolates was performed using MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Germany). Antibiotic susceptibilities were determined using the VITEK® 2 (bioMérieux, France) system according to the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The expression levels of the outer membrane porin protein OprD and the regulatory genes of efflux pumps (*mex*B, *mex*C, *mex*E, and *mex*X) were investigated using real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (Rt-qPCR). The *rps*L gene was used as the reference gene and *P.aeruginosa* PAO1 strain was used as the control strain in Rt-qPCR. Comparative expression analysis was calculated using the delta-delta cycle threshold (ΔΔCt) method. The presence of bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} and bla_{OXA-10} was investigated by PCR. Clonal relationships among the isolates were determined by AP-PCR using the M13 primer. Band profiles were analyzed using GelCompar II (Applied Maths) software. Decreased OprD expression was detected in 63.7% of the isolates and 74% of carbapenem-resistant isolates. The decrease in OprD expression was found to be significant only between the carbapenem-susceptible (n= 30) and carbapenem-resistant (n= 50) groups (p= 0.014). The overexpression rate of *mex*B was 82% in carbapenem-resistant isolates and 33% in carbapenem-susceptible isolates; 76.6% in multidrug-resistant (MDR) isolates and 45.5% in non-MDR isolates (p= 0.001 and p= 0.004, respectively). The overexpression rate of *mex*X was 68% and 40% in the amikacin-resistant and susceptible groups, respectively; and 64.3% and 40.4% in the

gentamicin-resistant and susceptible groups, respectively (p= 0.02 and p= 0.041, respectively). Overexpression of *mex*X was found in 61.7% of MDR isolates and 30.3% of non-MDR isolates (p= 0.006). No significant difference was found in the expression of *mex*C and *mex*E between antibiotic-susceptible and resistant groups. While bla_{OXA-10} was detected in 32% (16/50) of carbapenem-resistant isolates, bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} were not detected in any of the isolates. AP-PCR analysis identified 64 different genotypes and no dominant genotype was observed. The isolates were grouped into 14 different clusters with a clustering rate of 36%. RND efflux systems play a crucial role in the development of antibiotic resistance in *P.aeruginosa*. This study showed that overexpression of *mex*B and decreased expression of OprD contributed to the development of carbapenem resistance, while overexpression of *mex*X contributed to the development of amikacin and gentamicin resistance. Overexpression of *mex*B and *mex*X has significant correlation with MDR isolates. The detection of bla_{OXA-10} in 16 isolates suggests that the presence of this resistance gene may contribute to the development of carbapenem resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa; Rt-qPCR; outer membrane protein; carbapenem; gene expression.*

GİRİŞ

İnsanlarda mikrobiyota üyesi olarak da bulunabilen *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sepsis, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları, yara yeri enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu ciddi bir patojendir ve nozokomiyal enfeksiyonların da %10-15'inden sorumludur. *P.aeruginosa* doğal ve edinsel direnç mekanizmaları ile beta-laktam grubu antibiyotikler, aminoglikozidler, kinolonlar ve karbapenemleri de içeren farklı antibiyotiklere karşı direnç gösterebilmektedir. *P.aeruginosa* ve diğer gram-negatif bakterilerde bulunan porin kanalları özellikle beta-laktamların hücreye geçişini kontrol ederken substrata spesifik bir porin olan 'outer membrane porin D (OprD)' ekspresyonunda azalma veya porin kaybı antibiyotik direnciyle sonuçlanmaktadır[1].

Hücre içine çeşitli maddelerin girişinde OprD bariyer görevi görürken membranda bulunan dışa atım pompaları ise farklı substratların hücre dışına atılımından sorumlu transport proteinleridir. Dışa atım pompaları nükleik asit benzerliği, kullandığı enerji kaynağı, substrat türü gibi özelliklere göre beş farklı aileye ayrılmaktadır. Diğer dört aile hem gram-pozitif hem de gram-negatiflerde bulunurken 'resistance nodulation division (RND)' sadece gram-negatif bakterilerde bulunan ve direnç gelişiminde en çok rol oynayan dışa atım pompası ailesidir[2,3]. RND ailesi içinde MexAB-OprM dışa atım pompası en geniş substrat profiline sahiptir ve beta- laktamlar, kinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, sülfonamidler, vb. antibiyotiklerin hücre dışı atılımına bağlı direnç gelişiminde rol oynamaktadır. MexAB-OprM dışa atım pompası üç farklı transkripsiyonel düzenleyici gen lokusu ile kontrol edilmektedir. Bunlardan *mex*R ve *nal*D ekspresyonu baskılarken, *nal*C ise pozitif regülatör etki göstererek ekspresyon düzeyini arttırmaktadır[4]. MexCD-OprJ aktivitesi üzerinde negatif otoregülatör etkili *nfx*B genindeki mutasyonlar, özellikle dördüncü kuşak sefolosporinler olmak üzere beta-laktamlara, kinolon, tetrasiklin ve makrolidlere dirençten sorumludur. MexEF-OprN ise beta- laktamlara afinitesinin daha az olmasıyla diğer dışa atım pompalarından ayrılmaktadır. *mex*T geni, MexEF-OprN aktivitesini arttırarak kinolon, kloramfenikol ve trimetoprim direnç gelişiminde rol oynamaktadır[5]. Dış membran proteinini kodlayan gen içermeyen MexXY, transmembran etkisini OprM,

OpmB gibi dış membran proteinleri ile bağlantı kurarak gerçekleştirmektedir ve aminoglikozid, kinolon, eritromisin gibi ilaçlara direnç gelişiminde rol oynamaktadır. MexXY pompası ekspresyonunda negatif etkili olan *mex*Z geninde oluşan mutasyonlara bağlı olarak da MexXY aşırı ekspresyonu sonucu direnç gelişebilmektedir. *P.aeruginosa* en önemli nozokomiyal patojenlerden biridir ve direnç sorunu nedeniyle tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Mevcut tedavi seçenekleri arasında polimiksinler ve karbapenemler önemli antibakteriyel ajanlardır. Bununla birlikte günümüzde karbapenemlerin tedavide yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak artan direnç oranları söz konusudur[6]. Bu dirençten AmpC beta-laktamazlar, OprD porin mutasyonları, dışa atım pompası aktivitesinin artması ve karbapenemaz üretimi sorumlu tutulmaktadır. NDM, IMP ve VIM gibi metallo-beta-laktamazların yanında KPC, OXA gibi grup A ve grup D karbapenemazlar da direnç gelişiminde rol oynamaktadır[7]. Merkezlerin özellikle çok ilaca dirençli (ÇİD) patojenlerin direnç gelişimini izlemeleri ve etkenlerin direnç mekanizmalarını belirlemeleri, tedavide uygun antibiyotik seçimi ve direnç gelişiminin epidemiyolojik takibi için önemlidir. Çalışmada esas olarak, *P.aeruginosa* izolatlarının karbapenemler, aminoglikozidler, kinolon grubu antibiyotikler başta olmak üzere tedavide sık tercih edilen antibiyotiklere direnç gelişimi ile ÇİD'li izolat fenotipinin oluşmasında OprD dış membran proteini ile dışa atım pompalarının ekspresyon düzeylerinin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma izolatlarında KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-10 ve OXA-48 beta-laktamaz varlığı da değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 02.09.2021, Proje-Karar no: 2021-324).

Bakteriyel İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya 2019-2021 yılları arasında izole edilmiş, tekrar içermeyen 80 *P.aeruginosa* izolatı dahil edildi. İzolatlar tipik koloni morfolojileri, Gram boyama, oksidaz testi, şekerleri fermente edip etmemeleri gibi konvansiyonel mikrobiyolojik özelliklere ek olarak matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlandı.

İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri VITEK® 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] kriterlerine göre değerlendirildi. En az üç farklı gruptan antibiyotiğe dirençli izolatlar ÇİD olarak tanımlandı. İzolatların tümü karbapenem (meropenem ve imipenem), aminoglikozid, kinolon duyarlılığı ve ÇİD durumuna göre gruplandırıldı.

RNA Eldesi ve cDNA Sentezi

Ekstraksiyon öncesi -20 °C'de saklanan izolatlar triptik soy agara (TSA) ekildi ve 18-24 saat inkübe edildi. İzolatlardan total RNA eldesi TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher, ABD) kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Elde edilen RNA'nın saflığı mikroplak spektrofotometre Synergy H1 (Biotek, ABD) ile 260 nm/280 nm dalga boyunda

ölçüldü ve 1.9-2.1 arasında olan değerler çalışmaya dahil edildi. RNA'dan cDNA sentezi OneScript® Plus (Abmgood, ABD) kiti kullanılarak üretici önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. DNA saflığı optik dansite ölçümüyle belirlendi ve 260 nm/280 nm oranı 1.8-2 aralığında olanlar çalışmaya alındı.

Primer Tasarımı

Bu çalışmada MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY dışa atım pompalarının düzenleyici genleri olan *mex*B, *mex*C, *mex*E ve *mex*X ile OprD dış membran proteininin primer dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankasında bulunan gen dizileri referans alınarak Primer-BLAST ve Snapgene Viewer programıyla belirlendi. *P.aeruginosa* PAO1 kontrol suşu ve *rps*L ise referans gen olarak kullanıldı[8]. Karbapenemazlara ait primerler (bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} ve bla_{OXA-10}) önceki çalışmalar referans alınarak belirlendi (Tablo I).

Tablo I. *Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri*

Gen	Dizi (5′-3′)	Bant Büyüklüğü (baz çifti)	Referans
***mex*B**	ATG ACC ATC ACC GTG ACC TT	238	Bu çalışma
	AGA GTG GGT CCT GGA TGT TG		
***mex*C**	AGC CAG CAG GAC TTC GAT AC	243	Bu çalışma
	GGT CTG GGT GAA ATC CGC A		
***mex*E**	TCG CCG AAG TCA TCG AAC AA	525	Bu çalışma
	CGT CGA AGT AGG CGT AGA CC		
***mex*X**	TGT TCC AGA TCG ACC CTG C	159	Bu çalışma
	CTT CGG TGT ACT CGC GTT C		
***Opr*D**	GTG GCG ACT CGA TTT TCC TC	174	Bu çalışma
	CAG ACA TCT TGG TGC CAT CG		
***rps*L**	TAT ACA CCA CCA CGC CGA AA	240	Bu çalışma
	ACT TCG AAC GAC CCT GCT TA		
OXA-48	GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438	[7]
	CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG		
NDM	GCA GCT TGT CGG CCA TGC GGG C	782	[7]
	GGT CGC GAA GCT GAG CAC CGC AT		
VIM	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390	[7]
	CGA ATG CGC AGC ACC AG		
IMP	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT	188	[7]
	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T		
KPC	TGT CAC TGT ATC GCG GTC	900	[7]
	CTC AGT GCT CTA CAG AAA AAC		
OXA-10	GTC TTT CGA GTA CGG CAT TA	720	[7]
	ATT TTC TTA GCG GCA ACT TAC		

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Gerçek zamanlı kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Rt-qPCR)], üretici firma önerilerine göre BlasTaqTM 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials Inc., Kanada) kiti kullanılarak ABI 7500 Real-Time PCR cihazında (Applied Biosystems™, ABD) gerçekleştirildi. Rt-qPCR çalışmalarında Tablo I'de sunulan RND dışa atım pompası genleri (*mex*B, *mex*C, *mex*E, *mex*X) ve OprD için tasarlanan oligonükleotit primerleri kullanıldı. Her bir gen için 95 °C'de üç dakikalık başlangıç denatürasyonunun ardından; toplam 40 RT-qPCR döngüsü olacak şekilde, 95 °C'de beş saniye denatürasyon, 60 °C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzama basamakları uygulandı. Tüm Rt-qPCR testleri üç tekrarlı çalışıldı. Karşılaştırmalı ekspresyon düzeyi analizinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı[9]. Kontrol suşu olan Pseudomonas aeruginosa PAO1 ile karşılaştırıldığında; *mex*B için iki, *mex*C ve *mex*E için 100, *mex*X için ise 10 kat ve üzeri artış aşırı ekspresyon olarak değerlendirildi[3,10].

Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması

Karbapenemaz genlerinin (bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC} ve bla_{OXA-10}) varlığı Tablo I'de sunulan primerler kullanılarak araştırıldı. DNA ekstraksiyonu DNA4PCR (RTechMed, Türkiye) kiti kullanılarak üreticinin önerilerine göre gerçekleştirildi. bla_{KPC} için 2 µl bakteri DNA'sı, 1X PCR tampon çözeltisi, 2.0 mM MgCl2, 0.25 mM deoksinükleotit trifosfattan (dNTP), 20 pmol primer ve 1 U Taq DNA polimeraz (5 U/µl) (ABM, Kanada) içeren 25 µl PCR karışımı kullanıldı. Isı döngüsü, 95 °C'de beş dakika ilk denatürasyon; 95 °C'de 60 saniye denatürasyon, 58 °C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 90 saniye uzama ile toplam 36 döngü ve son uzama olarak 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı. Diğer karbapenemaz direnç genleri için 2.5 µl toplam DNA, 1 X PCR tamponu, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM her bir dNTP, 20 pmol primer seti, 0.25 U Taq DNA polimeraz (5 U/µL) (ABM, Kanada) içeren 25 µl reaksiyon karışımı kullanıldı. PCR döngüleri NDM, OXA-10 ve OXA-48 gen bölgeleri için 95 °C'de beş dakika ilk denatürasyon, 95 °C'de 45 saniye denatürasyon, 60 °C'de 45 saniye bağlanma ve 72 °C'de bir dakika uzama ile toplam 35 döngü ve son uzama olarak 72 °C'de sekiz dakika; IMP ve VIM gen bölgeleri için ise 94 °C'de beş dakika ilk denatürasyon, 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52 °C'de 40 saniye bağlanma ve 72 °C'de 50 saniye uzama ile toplam 36 döngü ve son uzama olarak 72 °C'de beş dakika şeklinde uygulandı. Amplifiye edilen ürünler; Safe View (ABM, Kanada) ile boyanmış %1'lik bir agaroz jelde, 40 dakika boyunca 100 V akımda elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülendi. Direnç genlerine ait ürünler doğrulanmak amacıyla saflaştırıldı ve dizilendi. Amplikonlarının dizi analizi MSM firması (İstanbul, Türkiye) tarafından yapıldı. PCR ürünleri Montage PCR clean up kit kullanılarak saflaştırıldı ve Big Dye terminator cycle dizileme kiti 3.1 (Applied BioSystem, ABD) ve Applied BioSystem model 3730XL DNA dizileme sistemi (Applied BioSystem, ABD) kullanılarak dizileme işlemi gerçekleştirildi. Her bir izolat için Bioedit yazılım programıyla düzenlenen sekans dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi [National Center for Biotechnology Information Gen-

Bank (NCBI-Gen Bankası)] veri tabanı üzerinde bulunan BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) dizi eşleştirme analiziyle değerlendirildi.

Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzolatların klonal ilişkisi 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3' dizisine sahip M13 primerinin kullanıldığı AP-PCR yöntemiyle belirlendi. PCR, 2 µl örnek DNA'sı, 48 µl 1X PCR tamponu, 0.2 mM dNTP karışımı, 4 mM Mg^{+2}, 50 pmol primer, 2.5 U Taq DNA polimeraz ve DNaz-RNaz içermeyen sudan oluşan karışımla yapıldı. AP-PCR, başlangıç denatürasyonu için 94 °C'de beş dakika, bağlanma için 38 °C'de beş dakika, sentez için 72 °C'de beş dakika olacak şekilde iki döngü ve sonrasında başlangıç denatürasyonu için 94 °C'de bir dakika, bağlanma için 40 °C'de bir dakika, sentez için 72 °C'de iki dakikadan oluşan 40 döngü olacak şekilde T100 (Bio-Rad, ABD) ısı döngüsü cihazında gerçekleştirildi[11]. Amplifikasyon ürünlerine 75 V akımla üç saat ve ardından 50 V akım ile bir saat olacak şekilde elektroforez uygulandı ve UV ışık altında görüntülendi. Bant profilleri GelCompar 2 (Applied Maths, Belçika) kullanılarak analiz edildi. Benzerlik oranları %90'ın üzerinde olan suşlar aynı klon olarak kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel yöntemlerle (histogram ve olasılık grafikleri) ve Kolmogorov-Smirnov testiyle araştırıldı. Kategorik değişkenler arasındaki fark Pearson ki-kare testi veya Fisher'in kesin testi kullanılarak değerlendirildi. $p< 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Toplam 80 *P.aeruginosa* izolatının 23 (%28.8)'ü yara, 15 (%18.8)'i endotrakeal aspirat, 11 (%13.8)'i kan, 10 (%12.5)'u idrar, 8 (%10)'i doku, 4 (%5)'ü endotrakeal aspirat, 3 (%3.75)'ü apse, 3 (%3.75)'ü balgam ve 3 (%3.75)'ü kemik iliği, plevra ve safra sıvısından oluşmuştur. Toplamda 80 *P.aeruginosa* izolatının 50 (%62.5)'si karbapenemlere (meropenem ve imipenem) dirençli, 30 (%37.5)'u karbapenemlere (meropenem ve imipenem) duyarlı olarak bulunmuştur. İzolatların %58.8 (n= 47)'i ÇİD olarak saptanmıştır. Çalışma izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılıkları Tablo II'de sunulmuştur.

qPCR analizlerine bakıldığında; OprD ekspresyonunda azalma yalnız karbapenem duyarlı ve dirençli grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışmada karbapenem duyarlı izolatların %46.7 (14/30)'sinde, karbapenem dirençli izolatların ise %74 (37/50)'ünde OprD ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ($p= 0.014$).

*mex*B geninin aşırı ekspresyonu karbapenem dirençli izolatların %82 (41/50)'sinde, duyarlı izolatların ise %33.3 (10/30)'ünde saptanmıştır ($p< 0.001$). Çok ilaca dirençli izolatlarda *mex*B aşırı ekspresyon oranı %76.6 (36/47), ÇİD olmayan izolatlarda ise %45.5 (15/33) olarak bulunmuştur ($p= 0.004$). *mex*X aşırı ekspresyonu amikasine dirençli ve duyarlı izolatlarda sırasıyla %68 (17/25) ve %40 (22/55) olarak bulunmuştur ($p= 0.020$). Bu oranlar gentamisin dirençli ve duyarlı izolatlarda ise sırasıyla %64.3 (18/52) ve %40.4

Tablo II. *İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları*

Antibiyotik	**Duyarlı**	**Dirençli**
	% (n)	% (n)
Meropenem	37.5 (30)	62.5 (50)
İmipenem	37.5 (30)	62.5 (50)
Siprofloksasin	30 (24)	70 (56)
Levofloksasin	21.2 (17)	78.8 (63)
Amikasin	68.6 (55)	31.2 (25)
Gentamisin	65 (52)	35 (28)
Çok ilaca direnç	**Var**	**Yok**
	58.8 (47)	41.2 (33)

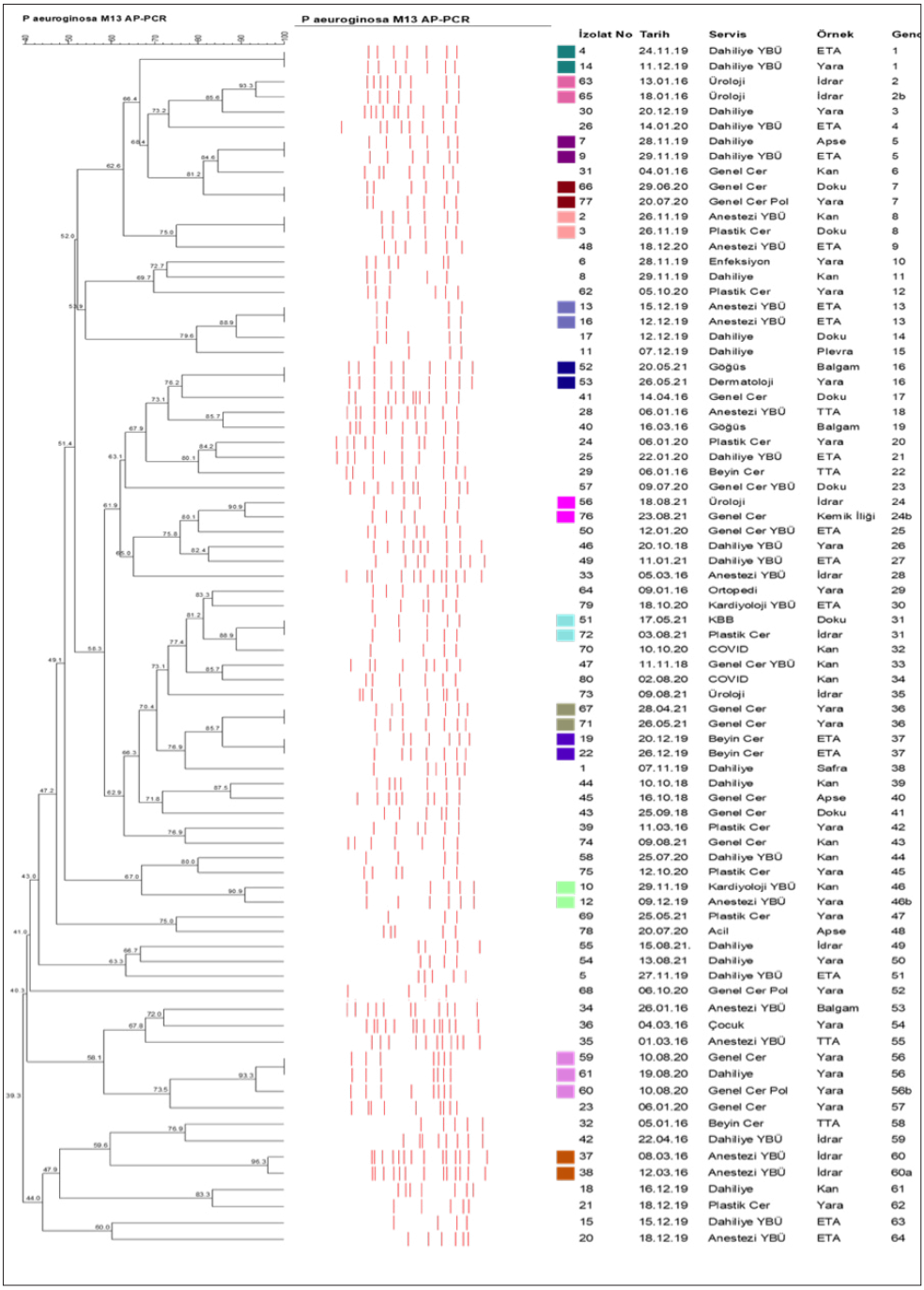
(21/28) olarak belirlenmiştir (p= 0.041). *mex*X aşırı ekspresyonu ÇİD olan izolatlarda %61.7 (29/47), ÇİD olmayan izolatlarda ise %30.3 (10/33) olarak saptanmıştır (p= 0.006). *mex*C ve *mex*E aşırı ekspresyonu açısından herhangi bir antibiyotik için dirençli ve duyarlı grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Farklı antibiyotik gruplarının duyarlılıklarına göre dışa atım pompası düzenleyici genleri ve OprD dış membran porin proteini ekspresyon düzeylerinin ilişkisi Tablo III'te sunulmuştur.

Karbapenem dirençli izolatların %32 (16/50)'sinde bla_{OXA-10} pozitifliği bulunmuş ve dizilemeyle doğrulanmıştır. Çalışmada araştırılan diğer karbapenemaz direnç genleri izolatlarda saptanmamıştır. Çalışma izolatlarında 64 farklı genotip tespit edilmiş ve izolatlar 14 farklı küme içinde gruplandırılmıştır (tolerans 1.0, optimizasyon 1.0, cut-off %90). İzolatların 29 tanesi herhangi bir küme içinde yer almış ve izolatlarda kümeleşme oranı %36 (29/80) olarak bulunmuştur (Şekil 1). bla_{OXA-10} pozitifliği içeren izolatların herhangi bir küme içinde gruplanmadığı saptanmıştır.

Tablo III. *Antibiyotik Direnci ile Dışa Atım Pompası Düzenleyici Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişki*

Antibiyotikler	**Direnç**	**OprD**	***mex*B**	***mex*C**	***mex*E**	***mex*X**
	n (%)			**p değeri**		
Meropenem	50 (62.5)	0.014*	<0.001*	0.083	0.167	0.265
İmipenem	50 (62.5)	0.014*	<0.001*	0.083	0.167	0.265
Siprofloksasin	56 (70)	0.243	0.094	0.589	0.171	0.698
Levofloksasin	63 (78.8)	0.634	0.053	0.430	0.072	0.340
Amikasin	25 (31.3)	0.975	0.124	0.886	0.975	0.020*
Gentamisin	28 (35)	0.679	0.294	0.911	0.679	0.041*
Çok ilaca direnç[1]	47 (58.8)	0.336	0.004*	0.218	0.649	0.006*

*Karbapenemlere dirençli izolatlarda artmış *mex*B düzeyleri ile azalmış OprD düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılık ifade ettiği saptanmıştır. Amikasin ve gentamisin dirençli izolatlarda artmış *mex*X düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çok ilaca dirençli izolatlarda artmış *mex*B ve *mex*X düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
[1]En az üç antibiyotiğe dirençli izolatlar.



Şekil 1. *AP-PCR çalışmasına ait dendogram görüntüsü.*

TARTIŞMA

P.aeruginosa izolatlarında farklı antibiyotiklere direnç gelişiminde genellikle çeşitli mekanizmaların eş zamanlı aktivasyonu rol oynamaktadır. Dış membran geçirgenliğinin düşük olmasının yanında dış membran üzerinde seçici geçirgenliği sağlayan porinlerin varlığı, beta-laktamazların üretimi, dışa atım pompalarının etkisinin artması direnç gelişimiyle sonuçlanan farklı mekanizmalara örnek oluşturmuştur[12].

Serin proteaz olarak görev yapmasının yanında OprD özellikle gram-negatif bakterilerin dış membranlarında yarı geçirgen bir bariyer yapısı oluşturan dış membran proteinidir. Hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli besinlerin yanı sıra özellikle beta-laktam, aminoglikozid, kinolon gibi antibiyotiklerin de transportunda görev almaktadır. OprD'nin özellikle imipenem olmak üzere karbapenemlerin hücre içine alımında temel giriş yolu olduğu saptanmış olup, OprD ekspresyonunda azalma veya yapısında değişikliklere neden olan mutasyonların sonucunda başta karbapenemler olmak üzere çeşitli antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir[13]. Literatürde karbapenem dirençli izolatlar ile yapılan üç farklı çalışma incelendiğinde azalmış OprD ekspresyonu oranları %61.2, %62.2 ve %78.4 olarak bulunurken, bu çalışmalarda OprD aracılı direncin karbapenem direnci gelişiminde başlıca mekanizmalardan biri olduğu belirtilmiştir[10,14,15]. Bu çalışmada da üç farklı çalışmayla uyumlu olarak karbapenem dirençli izolatların %74'ünde OprD ekspresyonunda azalma gözlenmiş olup karbapenem duyarlı grupla anlamlı fark saptanmıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde, çalışmada aminoglikozidler ve kinolonlar gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde dış membran porin geçirgenliğinin azalmasının temel bir rol oynamadığı; buna karşın, karbapenemlerin hücre membranından hücre içine alımını azaltarak karbapenem duyarlılığının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.

Gram-negatiflerde çeşitli antibiyotiklere gelişen dirençte rol oynayan bir diğer mekanizma da dışa atım pompalarıdır. RND ailesi özellikle gram-negatif bakterilerde direnç gelişiminde en çok aktif rol oynayan dışa atım pompası iken aktivitesini dış membran faktörü, sitoplazmik membran transport proteini ve bu iki yapı arasında bağlantı görevi gören periplazmik membran füzyon proteini aracılığıyla üçlü bir yapı oluşturarak göstermektedir[16]. RND ailesine ait temel ve direnç gelişiminde en çok rol oynayan dışa atım pompası MexAB-OprM'dir. *mex*B geni MexAB-OprM pompasının düzenleyici geni olmakla birlikte artmış *mex*B ekspresyonu direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır.

Yanık hastalarından alınan 107 *P.aeruginosa* izolatıyla yapılan bir çalışmada karbapenemlere direnç gelişiminde temel mekanizmanın *mex*B aşırı ekspresyonu olduğu belirtilmiş ve karbapenem dirençli izolatların %63.2'sinde *mex*B aşırı ekspresyonu saptanmıştır[17]. Yine 243 *P.aeruginosa* izolatının yer aldığı bir çalışmada da izolatların %60.9'unda *mex*B aşırı ekspresyonu saptanmış; karbapenem direnci gelişiminde MexAB-OprM ile birlikte MexXY-OprM ve OprD aktivitesinin birlikte etklili olduğu gösterilmiştir[18]. Yakın zamanda yapılan iki benzer çalışmada ise, Goli ve arkadaşları 100 izolatın %67'sinde, Bialvaei ve arkadaşları ise 122 izolatın %69'unda *mex*B aşırı ekspresyonu saptamışlardır.

Her iki çalışmada karbapenem dirençli izolatlarda karbapenem duyarlı gruba göre anlamlı *mex*B aşırı ekspresyonu gözlemlemişlerdir. RND ailesi içindeki farklı dışa atım pompalarının aktivitesinin artışı karbapenem direnci ile sonuçlanırken, literatürdeki çalışmalarla paralel olarak bu çalışmada izolatların %63.7'sinde, karbapenem dirençli izolatların ise %82'sinde *mex*B aşırı ekspresyonu saptanmış ve karbapenem dirençli ile duyarlı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Yine bu iki çalışmada, ÇİD izolatlarda ise *mex*B aşırı ekspresyonu sırasıyla %79.1 ve %80 olarak bulunmuş ve ÇİD olmayan izolatlar ile anlamlı fark saptanmıştır[3,15]. Çalışmada ÇİD izolatların %76.6'sında *mex*B aşırı ekspresyonu saptanmış ve bu oran ÇİD olmayan izolatlar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çok ilaca dirençli izolatlar gelişiminde farklı antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalar etkili olabilirken; bu çalışmadaki bulgular, karbapenem direncinin araştırıldığı farklı literatür verileriyle uyumlu olup karbapenem direnci ve ÇİD gelişiminde *mex*B aşırı ekspresyonunun etkili bir mekanizma olduğunu göstermiştir. Çalışmaların, antibiyotiklere değişen duyarlılıktaki izolatlarla yürütülmesi literatürde farklı verilerin bildirilmesine neden olabilmektedir. Türkiye'den bildirilen bir çalışmada 951 *P.aeruginosa* izolatında *mex*B aşırı ekspresyon oranı %16.3 gibi düşük bir oranda raporlanmıştır. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, *mex*B aşırı ekspresyon oranlarının farklı bulunmasının bir nedeninin, bahsedilen çalışmadaki karbapenem dirençli izolat oranının %46 gibi düşük oranda olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür[19].

OprM, OpmB, OpmG gibi dış membran proteinleri üzerinden etkisini gösteren MexXY dışa atım pompasının özellikle aminoglikozidler olmak üzere beta-laktam ve tetrasiklin gibi antimikrobiyaller ile ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir. MexXY üzerinde pozitif indükleyici olan *arm*Z geninin uyarılması ve negatif düzenleyici olan *mex*Z genindeki mutasyonların *mex*X aşırı ekspresyonuna bağlı gelişen aminoglikozid direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir[20]. Ameliyat sonrası *P.aeruginosa*'ya bağlı gelişen yara enfeksiyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada, aminoglikozid dirençli izolatların %62.5'inde MexXY aşırı ekspresyonu saptanmıştır[21]. *P.aeruginosa* izolatlarında direnç nedenlerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 100 izolatın %76'sında MexXY dışa atım pompası aşırı ekspresyonu gözlenmiştir[5]. Ancak her iki çalışmada da araştırmacılar direnç gelişiminde en önemli mekanizmanın aminoglikozid düzenleyici enzimler olduğunu, MexXY aşırı ekspresyonunun ise yardımcı mekanizma olduğunu ifade etmişlerdir. Bialvaei ve arkadaşlarının 122 *P.aeruginosa* izolatıyla yaptıkları çalışmada[3], izolatların %74.6'sında MexXY aşırı ekspresyonu saptanmış, hem amikasin hem de gentamisin dirençli grupta duyarlı grup ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, amikasin dirençli izolatların %68 ve gentamisin dirençli izolatların ise %64.3'ünde MexXY aşırı ekspresyonu saptanmıştır ve duyarlı gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (sırasıyla p= 0.020, p= 0.041). Çalışmanın bulguları dünyanın farklı bölgelerinde yapılan literatür verileriyle benzer olarak MexXY aktivitesinin artmasının özellikle aminoglikozidlerin hücre dışına atılımını hızlandırarak duyarlılık oranlarının azalmasından sorumlu olabileceğini göstermiştir. Ancak aminoglikozidlere karşı direnç gelişiminde birden fazla mekanizmanın aynı anda etkili olabileceği göz önünde

bulundurulmalıdır. Bu nedenle, direnç oluşumunda rol oynayan diğer faktörlerin de araştırılması ve değerlendirilmesi gerekmektedir.

Karbapenemler, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir seçenek olmalarına rağmen son yıllarda bu antibiyotiklere karşı direnç oranları hızla artmaktadır. Hücre zarının geçirgenliğinin azalması, dışa atım pompalarının aktivasyonu ve karbapenemaz üretimi bu grup antibiyotiklere direnç gelişiminde temel mekanizmaları oluşturmaktadır. Sınıf B karbapenemazlar (Metallo-beta-laktamazlar) beta-laktamlar üzerinde geniş spektrumlu etkisi nedeniyle en önemli karbapenemazlar olarak bilinse de OXA-10 ve OXA-48'i içeren sınıf D karbapenemazlar salgınlara neden olabilmesi nedeniyle önemlidir[22,23].

Literatürde karbapenemaz genlerinin varlığının araştırıldığı farklı çalışmalar incelendiğinde, coğrafik farklılıklar nedeniyle dirençten sorumlu başlıca gen ve genlerin görülme oranlarının son derece farklı olduğu görülmüştür. bla_{OXA-10} varlığı araştırılan iki farklı çalışmada izolatların %32.2'sinde ve %23.6'sında direnç geni saptanmıştır[24,25]. Bu çalışmaların aksine, farklı çalışmalarda bla_{OXA-10} oranı daha düşük oranlarda bulunmuş; bla_{OXA-10}, dört farklı çalışmadaki izolatlarda sırasıyla %0.8,%2.5, %2.6 ve %14 olarak raporlanmıştır[6,26-28]. bla_{VIM} varlığının araştırıldığı 252 izolatın dahil edildiği bir çalışmada bla_{VIM} varlığı saptanmazken, farklı iki çalışmada ise bu oranlar %6.3 ve %6.8 olarak bildirilmiştir[19,26,29]. Hoşbul ve arkadaşları, 100 karbapenem dirençli *P.aeuruginosa* izolatıyla yaptıkları çalışmalarında[7], sadece bir izolatta bla_{VIM} geni saptamışlardır. Bu çalışmalardaki düşük oranların aksine, Costa ve arkadaşları[30] *P.aeruginosa* izolatlarının %25.6'sında bla_{VIM} varlığını saptamışlardır. Müderris ve arkadaşları tarafından[19] *P.aeruginosa* izolatlarında %5 oranında bla_{KPC} geni raporlanmıştır. Türkiye'de yapılan birçok çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında bla_{IMP}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48} direnç genleri tespit edilememiştir[7,19,27,31]. Çalışmada, karbapenem dirençli izolatlarda bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} ve bla_{OXA-48} geni saptanmazken; izolatların %32 (n= 16)'sinde bla_{OXA-10} geni bulunmuştur. Geniş spektrumlu karbapenemazların aksine daha dar spektrumda etki gösteren ve özellikle *P.aeruginosa* izolatlarında bildirilirken OXA-10, karbapenem hidrolizi ile direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Çalışmada bla_{OXA-10} varlığı saptanan izolatlarda özellikle MexAB-OprM dışa atım pompası aktivitesinin artmış olarak bulunması, bu iki mekanizmanın birlikte direnç gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir. bla_{OXA-10} pozitifliği saptanan izolatlarda AP-PCR ile herhangi bir kümeleşme saptanmamakla birlikte, özellikle yoğun bakımlarda karbapenemaz üreten *P.aeruginosa* izolatlarına bağlı salgınlar görülebileceği her zaman göz önünde bulundurulmalı ve izolasyon önlemlerine dikkat edilmelidir[10].

Çalışmaya, çeşitli antibiyotiklere farklı duyarlılığa sahip tekrar içermeyen 80 *P.aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların direnç fenotipinde OprD dış membran proteini ile birlikte, dışa atım pompaları ve karbapenemaz varlığının etkileri araştırılmıştır. Çalışma neticesinde değerli literatür verileri sağlanmış olsa da çalışmanın tek merkezli olması, belirli sayıda antibiyotik duyarlılığının test edilmiş olması ve antibiyotiklere direnç gelişimine neden olabilecek sınırlı sayıda mekanizmanın araştırılmış olması çalışmanın başlıca eksiklikleridir. Direnç profillerinin ve dirençten sorumlu mekanizmaların saptan-

ması, direnç gelişiminin kontrolünde son derece önemlidir ve bunun sağlanmasında çok merkezli ve kapsamlı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

P.aeruginosa'ya bağlı enfeksiyonların tedavisinde en önemli seçeneklerden biri olan karbapenemlere birçok mekanizma aracılığıyla direnç gelişebilmektedir. Bu çalışmada, karbapenem direnç gelişiminde OprD dış membran proteini geçirgenliğiyle MexAB-OprM dışa atım pompasının etkilerinin olduğu, buna ek olarak bla_{OXA-10} karbapenemaz aracılı direncin de katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Yine aminoglikozid grubu ilaçlara karşı oluşan dirençte MexXY; ÇİD gelişiminde ise MexAB-OprM ile birlikte MexXY dışa atım pompasının rolü olduğu saptanmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 02.09.2021 ve Karar No: 2021-324).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotech Advances 2019; 37(1): 177-92. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
2. Terzi HA. Pseudomonas aeruginosa resistance mechanisms: Efflux pump systems. Ankem Derg 2016; 30(3): 123-32. https://doi.org/10.5222/ankem.2016.123
3. Zahedi bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Mardani dashti Y, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical strains. Microbial Pathogen 2021; 153(February): 104789. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104789
4. Choudhury D, Ghosh A, Chanda DD, Talukdar A Das, Choudhury MD, Paul D, et al. Premature termination of MexR leads to overexpression of MexAB-OprM efflux pump in Pseudomonas aeruginosa in a tertiary referral hospital in India. PLoS One 2016; 11(2): 1-12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149156
5. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M, et al. Contribution of mexAB-oprM and mexXY (-oprA) efflux operons in antibiotic resistance of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates in Tabriz, Iran. Infection, Gen Evol 2016; 45: 75-82. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.022
6. Tanriverdi Çaycı Y, Çınar C, Gür Vural D, Bilgin K, Birinci A. Investigation of aminoglycoside resistance in enterobacteriaceae and nonfermantative gram negatif bacteria. Van Med J 2021; 28(1): 62-7. https://doi.org/10.5505/vtd.2021.59320
7. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Özcan H, Gümral R. In vitro activity of ceftazidime-avibactam and colistin against carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. İstanbul Tıp Fakültesi Derg 2022; 85(3): 355-61. https://doi.org/10.26650/IUITFD.1092556
8. Arabestani MR, Rajabpour M, Mashouf RY, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump mex-ab-oprm and oprd of pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using qrt-pcr. Arch Iranian Med 2014; 18(2): 102-8.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 2001; 25(4): 402-8. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
10. Feng W, Huang Q, Wang Y, Yuan Q, Li X, Xia P, et al. Changes in the resistance and epidemiological characteristics of Pseudomonas aeruginosa during a ten-year period. J Microbiol Immunol Infect 2021; 54(2): 261-6. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.08.017

11. Gulcan H, Kuzucu C, Durmaz R. Nosocomial Stenotrophomonas maltophilia cross-infection: Three cases in newborns. Am J Infect Control 2004; 32(6): 365-8. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.07.003
12. Dantas RCC, Silva RTE, Ferreira ML, Gonçalves IR, Araújo BF, De Campos PA, et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa: The relevance of intrinsic resistance mechanisms. PLoS One 2017; 12(5): 1-14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774
13. Suresh M, Nithya N, Jayasree PR, Vimal KP, Manish Kumar PR. Mutational analyses of regulatory genes, mexR, nalC, nalD and mexZ of mexAB-oprM and mexXY operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. World J Microbiol Biotech 2018; 34(6): 0. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2465-0
14. Wang J, Zhou J ying, Qu T ting, Shen P, Wei Z qing, Yu Y song, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Chinese hospitals. Int J Antimicrobial Agents 2010; 35(5): 486-91. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.014
15. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Kafil HS, Aghazadeh M, et al. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Infect Public Health 2018; 11(3): 364-72. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.016
16. Colclough AL, Alav I, Whittle EE, Pugh HL, Darby EM, Legood SW, et al. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; Regulation, structure and role in antibiotic resistance. Future Microbiol 2020; 15(2): 143-57. https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0235
17. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A, 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): 127-32. https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.08.016
18. Khalili Y, Yekani M, Goli HR, Memar MY. Characterization of carbapenemresistant but cephalosporinsusceptible Pseudomonas aeruginosa. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2019; 66(4): 529-40. https://doi.org/10.1556/030.66.2019.036
19. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydogan S, et al. Role of efflux pump and oprD porin expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. J Infect Develop Countr 2018; 12(1): 1-8. https://doi.org/10.3855/jidc.9486
20. 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. https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09
21. Awan AB, Yan A, Sarwar Y, Schierack P, Ali A. Detection of synergistic antimicrobial resistance mechanisms in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from post-operative wound infections. Appl Microbiol Biotech 2021; 105(24): 9321-32. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11680-6
22. Olaniran OB, Adeleke OE, Donia A, Shahid R, Bokhari H. Incidence and molecular characterization of carbapenemase genes in association with multidrug-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from tertiary healthcare facilities in Southwest Nigeria. Curr Microbiol 2022; 79(1): 1-14. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02706-3
23. Kotsakis SD, Flach CF, Razavi M, Joakim Larsson DG. Characterization of the first OXA-10 natural variant with increased carbapenemase activity. Antimicrobial Agents Chemotherapy 2019; 63(1): 1-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01817-18
24. Shahin M, Ahmadi A. Molecular characterization of NDM-1-producing Pseudomonas aeruginosa isolates from hospitalized patients in Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrobial 2021; 20(1): 1-10. https://doi.org/10.1186/s12941-021-00482-3
25. Hashemi AB, Nakhaei Moghaddam M, Forghanifard MM, Yousefi E. Detection of blaOXA-10 and blaOXA-48 genes in Pseudomonas aeruginosa clinical ısolates by multiplex PCR. J Med Microbiol Infect Dis 2021 ;9(3): 142-7. https://doi.org/10.52547/JoMMID.9.3.142
26. Hansen F, Johansen HK, Østergaard C, Arpi M, Hansen DS, Littauer P, et al. Characterization of carbapenem nonsusceptible pseudomonas aeruginosa in Denmark: A nationwide, prospective study. Microbial Drug Resistance 2014; 20(1): 22-9. https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0085

27. Ragbetli C, Güdücüoğlu H, Parlak M. Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edilen Çoklu İlaç Dirençli Acinetobacter and Pseudomonas İzolatlarında Karbapenem Direncinin Araştırılması. J Contemporary Med 2019; 9(March 2016): 275-9. https://doi.org/10.16899/jcm.609560

28. Kao CY, Chen SS, Hung KH, Wu HM, Hsueh PR, Yan JJ, et al. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. BMC Microbiology 2016; 16(1): 1-8. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0719-2

29. Lee YL, Lu MC, Shao PL, Lu PL, Chen YH, Cheng SH, et al. Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among clinically important Gram-negative bacteria, with an emphasis on carbapenems and colistin: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2018. Int J Antimicrobial Agents 2019; 54(3): 318-28. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.06.009

30. Tomás JS, Lima CA, Vera-leiva A, San I, Magdalena M, Bello-toledo H, et al. Carbapenemasas en aislamientos de 2021; 38(1): 81-7. https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100081

31. Aksoy MD, Tuğrul HM. Investigation of metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa strains by phenotypic and genotypic methods. FLORA 2020; 25(3): 301-7. https://doi.org/10.5578/flora.68921