

Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarındaki Antibiyotik Direncinin Moleküler Analizi

Molecular Analysis of Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Isolated from Clinical Samples

Gülşah ALTAN^{1,2}(ID), Erva RAKICI²(ID), Osman Birol ÖZGÜMÜŞ²(ID)

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Türkiye.

² Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.

² Recep Tayyip Erdogan University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Rize, Türkiye.

*Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 20.05.2022 tarihli kararıyla TDK-2022-1374 proje numarası ile desteklenmiştir.

** Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı'nda Gülşah Altan'ın doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Makale Atfı: Altan G, Rakıcı E, Özgümüş OB. Klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarındaki antibiyotik direncinin moleküler analizi. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):148-170.

ÖZ

Pseudomonas aeruginosa riskli hasta gruplarında morbidite ve mortalitede artışa neden olan fırsatçı patojendir. Karbapenem direncinin tehdit haline geldiği günümüzde, direnç genleri mobil genetik elemanlar aracılığıyla türler arasında yayılmaktadır. *P.aeruginosa* arasında karbapenemazların yayılımı, enfeksiyonların tedavisindeki seçenekleri sınırlamasından dolayı ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Bu çalışmada, Ekim 2021 ile Mart 2023 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakterioloji Biriminde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 47 adet karbapeneme dirençli *P.aeruginosa* (KDP) izolatının moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır. Antibiyotiklere karşı direnç oranları, bazı karbapenemaz ve virülans genleri, konjugatif direnç plazmitleri, integron gen kaseti içerikleri ve izolatlar arasındaki klonal benzerlikler araştırılmış ve epidemiyolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, bakteri izolatlarının tanımlanması ve bazı antibiyotiklere (imipenem, meropenem, aztreonam, amikasin, netilmisin, tobramisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, siprofloksasin ve levofloksasin) karşı duyarlılık testleri VITEK®2 Compact otomatize sistemle yapılmıştır. İzolatların metalo-beta-laktamaz (MBL) üretimi imipenem/meropenem-EDTA (IMP/MEM-EDTA) kombine disk yöntemiyle gösterilmiştir. Konjugasyon deneyleri sıvıda çiftleştirme (broth mating) yöntemiyle yapılmıştır. Plazmit DNA izolasyonlarında alkali lizis yöntemi kullanılmıştır. Transkonjugantlardaki ko-transfer edilen antibiyotik dirençleri disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Karbapenemaz genleri (bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} , bla_{KPC} ve bla_{OXA-48}), integron gen kasetleri (sınıf 1 ve sınıf 2) ve virülans genleri ($lasR$ ve $rhIR$) polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile belirlenmiştir. İzolatların klonal ilişkileri 'enterobacterial repetitive intergenic consensus' (ERIC)-PCR'den elde edilen DNA parmak izi analizlerinin

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İslampaşa Mahallesi, Rize, Türkiye. Tel (Phone): 0533 772 51 10, E-posta (E-mail): ozgumus.ob@erdogan.edu.tr

değerlendirilmesiyle araştırılmıştır. Karbapeneme dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının en dirençli bulunduğu antibiyotik levofloksasin olup en düşük direnç oranları tobramisin, gentamisin ve amikasinine karşı gözlenmiştir. Yirmi beş (%53.2) izolatta MBL üretimi tespit edilmiştir. Konjugasyon deneylerinde 12 (%25.5) izolatta konjugatif direnç plazmiti belirlenmiştir. KDPA izolatlarının %90'unda PCR ile *lasR* ve *rhIR* (transkripsiyonel aktivatör proteini kodlayan genler) biyofilm genleri belirlenmiştir. Altı (%12.8) izolatta *bla_{VIM}* geni, beş (%10.6) izolatta *bla_{NDM}* geni, üç (%6.4) izolatta *bla_{OXA-48}* geni saptanmıştır. *bla_{KPC}* ve *bla_{IMP}* genleri KDPA izolatlarında tespit edilmemiştir. Konjugatif plazmit içeren izolatların ikisinin (%16.6) *bla_{VIM}* geni, birinin (%8.3) *bla_{NDM}* geni, birinin (%8.3) *bla_{OXA-48}* geni taşıdığı belirlenmiştir. İntegron-spesifik PCR ile 39 (%82.9) izolatta *intI1* geni tespit edilirken, 24 (%51)'ünün sınıf 1 integron gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Konjugatif plazmit içeren izolatların altısının sınıf 1 integron gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. KDPA izolatlarında sınıf 2 integronlara rastlanmamıştır. ERIC-PCR paternlerinin dendrogram analizinde KDPA izolatları arasında klonal benzerlik olmadığı ve izolatların çapraz bulaş ile yayılmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, *lasR* ve *rhIR* biyofilm genlerine sahip bazı KDPA izolatlarının çoğunun karbapenemler haricinde diğer antibiyotik gruplarına da yüksek oranda direnç gösterdiği ve bazı antibiyotik dirençlerini (seftazidim, sefepim, siprofloksasin, levofloksasin, piperasilin-tazobaktam) konjugatif direnç plazmitleriyle ko-transfer edebildiği görülmüştür. Klinik arenada salgına neden olabilecek potansiyeldeki bu suşların direnç gen rezervuarlarında moleküler epidemiyolojik olarak takip edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*; karbapenem direnci; konjugatif plazmit; integron; virülans geni.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes increased morbidity and mortality in risky patient groups. Nowadays, carbapenem resistance has become a threat and resistance genes are spreading among species through mobile genetic elements. The dissemination of carbapenemases among *P.aeruginosa* is a serious public health concern due to its limited options for the treatment of bacterial infections. In this study, it was aimed to investigate the molecular epidemiology of 47 carbapenem resistant *P.aeruginosa* (CRPA) isolates derived from various clinical samples from the Central Laboratory Bacteriology Unit of Kocaeli University Research and Training Hospital between October 2021 and March 2023. The rates of resistance to the antibiotics, some carbapenemase and virulence genes, conjugative resistance plasmids, integron gene cassette contents and the clonal similarity of the isolates were investigated and then epidemiologically evaluated. In the study, identification of the bacterial isolates and their susceptibility to some antibiotics (imipenem, meropenem, aztreonam, amikacin, netilmicin, tobramycin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin and levofloxacin) were determined by the VITEK® 2 Compact automated system. Metallo-beta-lactamase (MBL) production of the isolates was demonstrated by the imipenem/meropenem-EDTA (IMP/MEM-EDTA) combined disc method. Conjugation experiments were performed by the broth mating method. Alkali lysis method was used in plasmid DNA isolations. Co-transferred antibiotic resistances in transconjugants were detected by disc diffusion method. Carbapenemase genes (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* and *bla_{OXA-48}*), integron gene cassettes (class 1 and class 2) and virulence genes (*lasR* and *rhIR*) were screened by specific polymerase chain reactions (PCRs). Clonal relationships of the CRPA isolates were investigated by evaluating the DNA fingerprintings obtained from the ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR assay. The highest resistance rate of the isolates were to levofloxacin, while the lowest resistance rates were observed against tobramycin, gentamicin and amikacin. MBL production was detected in 25 (53.2%) isolates. In conjugation experiments, 12 (25.5%) isolates were detected to harbour conjugative resistance plasmids. In 90% of the CRPA isolates, *lasR* and *rhIR* biofilm genes (encoding for the transcriptional activator protein) were detected by PCR. The *bla_{VIM}* gene was detected in six (12.8%) isolates. The *bla_{NDM}* gene was detected in five (10.6%) isolates and the *bla_{OXA-48}* gene was detected in three (6.4%) isolates. The *bla_{KPC}* and *bla_{IMP}* genes were not detected in CRPA isolates. It was determined that two (16.6%) of the isolates that carried the *bla_{VIM}* gene, one (8.3%) carried the *bla_{NDM}* gene and one (8.3%) carried the *bla_{OXA-48}* gene contained conjugative plasmids. In integron-specific PCRs, *intI1* gene was positive in 39 (82.9%) isolates,

while class 1 integron gene cassettes were detected in 24 isolates (51%). *Int1* positive six isolates were found to harbour class 1 integron gene cassettes-bearing conjugative plasmids. Class 2 integrons were not found in the CRPA isolates. Dendrogram analysis of ERIC-PCR patterns showed that there was no clonal similarity between the CRPA isolates and the isolates did not spread by cross-contamination. As a result, it has been observed that most of the CRPA isolates which have the potential to form biofilms, are highly resistant to other antibiotic groups other than carbapenems and can co-transfer some resistances (ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, levofloxacin, piperacillin-tazobactam) with conjugative resistance plasmids. It is thought that it would be useful to follow molecular epidemiology in the resistance gene reservoirs of these strains which have the potential to cause epidemics in the clinical arena.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenem resistance; conjugative plasmid; integron; virulence gene.

GİRİŞ

Sağlıklı bireylerin normal mikrobiyotasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa* immüno-supresyon, invaziv girişim, travma, hastanede yatış ve yaşlılık gibi durumlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan gram-negatif bir patojendir. Yumuşak doku, idrar yolu, solunum yolu enfeksiyonlarına ve bakteriyemiye yol açmaktadır. Riskli hasta gruplarında morbitide ve mortalitede artışa neden olmaktadır. *P.aeruginosa*, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından hastaneye ilişkili enfeksiyonlara ve salgınlara neden olan öncelikli altı mikroorganizmadan biri olarak tanımlanmıştır. Çeşitli direnç mekanizmalarını kullanarak hızlı direnç geliştirmektedir. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarında antibiyotik tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır¹.

Kromozomal mutasyonlar ve mobil genetik elemanlar aracılığıyla direnç geliştirme yeteneğine sahip olan *P.aeruginosa* izolatlarında β -laktamazları, özellikle karbapenemazları kodlayan direnç genlerinin varlığı çok ilaca dirençli (ÇİD) suşların artışına neden olmaktadır². Karbapenemaz enzimi üreten *P.aeruginosa* izolatları karbapenem direncine yol açmaktadır. Kromozomal mutasyonlar nedeniyle gelişen direnç mekanizmasında indüklenebilir AmpC β -laktamazın üretiminde ve effluks pompalama sistemlerinin ekspresyonunda artış ve membran geçirgenliğinde azalma meydana gelmektedir. Yatay gen transferi yoluyla meydana gelen dirençte aktarılan direnç genleri konjugatif plazmitler, bla_{VIM} genini taşıyan sınıf 1 integronlar ve insersiyon sekansı gibi mobil genetik elemanlar üzerinde bulunmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı KDPA izolatları çok ilaca dirençlidir³. *las* ve *rhl* genleri tarafından düzenlenen, virülans faktörlerini ve biyofilm oluşumunu yöneten "quorum sensing (QS)" sistemleri de *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncine neden olmaktadır⁴.

Günümüzde karbapenem direnci küresel bir tehdit haline gelmiştir. Çok ilaca direnç mobil genetik elemanlarla ilişkilendirilmiştir. Karbapenemler dahil çoğu β -laktama karşı dirence neden olan genler mobil genetik elemanlar aracılığıyla küresel boyutta yayılmaktadır. Direncin altında yatan moleküler mekanizmayı ortaya çıkarmak önem arz etmektedir⁵.

Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni olarak sıklıkla karşılaşılan fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa*'da karbapenem direncine neden olan karbapenemaz genlerinin, integron içeriklerinin, konjugatif plazmitlerin ve izolatların klonal benzerliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 24/03/2022 ve Karar No: 2022/06.06).

Bakteri İzolatları

Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteri-yoloji Birimine Ekim 2021 ile Mart 2023 tarihleri arasında servis, poliklinik ve yoğun bakımdaki hastalar için kültür isteğiyle gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 47 adet KDPA izolatu çalışmaya alındı. Mükerrer örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Klinik örnek kültürlerinde üreyen aerop ve oksidaz pozitif, floresan pigmentli, non-fermentatif koloniler VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak tanımlandı ve sonraki analizler için beyin-kalp infüzyon (BKİ) sıvı besiyerinde üretildikten sonra %20 gliserollü ve boncuklu saklama besiyerinde -80 °C'de stoklandı. Diğer tüm deneyler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzolatların antibiyotiklere (imipenem, meropenem, aztreonam, amikasin, netilmisin, tobramisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, siprofloksasin ve levofloksasin) karşı hassasiyet testleri VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapıldı. Sonuçlar Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST)⁶ rehberine göre, gentamisin ve netilmisine karşı duyarlılık sonuçları ise Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020)⁷ rehberine göre değerlendirildi.

Metalo-Beta-Laktamaz Üretimi

Metalo-beta-laktamaz üretimi imipenem/meropenem-EDTA (IMP/MEM-EDTA) kombine disk yöntemiyle belirlendi⁸. Mueller-Hinton agar (MHA) plağına 0.5 McFarland bulanıklığındaki ($\sim 1.5 \times 10^8$ koloni oluşturan birim/mL - KOB/mL) bakteri süspansiyonu ekildi ve ikişer adet imipenem (IMP) ve meropenem (MEM) diskleri (Bioanalyse, Ankara) yerleştirildi. İmipenem ve meropenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 µL EDTA solüsyonu damlatıldı ve absorbe edildi ve 35 °C' de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra IMP ve MEM diskleri ile IMP/EDTA ve MEM/EDTA diskleri etrafındaki zon çapının ≥ 7 mm olması MBL pozitifliği olarak kabul edildi.

Konjugasyon Deneyleri

Konjugasyon deneyleri sıvıda çiftleşme (broth mating) yöntemi ve küçük modifikasyonlar kullanılarak yapıldı⁹. Beyin-kalp infüzyon agar besiyerinde üretilen verici (klinik

P.aeruginosa KUP izolatları) ve alıcı *P.aeruginosa* PU21 (ilvBII2 leu-I str-1, RifR) (Dr. George A. Jacoby, Lahey Clinic Medical Center, Burlington'dan sağlandı) suşların canlı bakteri sayımları yapıldı. Canlı bakteri sayısı (KOB/mL) konjugasyon etkinliğinin hesaplanması için kullanıldı. Verici ve alıcı suşlar 1:1 oranında karıştırıldı ve bir gece 37 °C' de sallanmadan inkübe edildi. Seftazidim (1 µg/mL) ve rifampisin (200 µg/mL) içeren BKİ agarda transkonjugantlar seçildi. Verici suşların konjugasyon etkinliğinin hesabı için aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı: konjugasyon etkinliği= transkonjugant (KOB/mL) / verici hücre (KOB/mL).

Transkonjugantların Antibiyotik Duyarlılık Testi

Transkonjugantların antibiyotiklere dirençleri disk (Bioanalyse, Ankara) (imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, aztreonam 30 µg, amikasin 30 µg, netilmisin 10 µg, tobramisin 10 µg, piperasilin 30 µg, piperasilin/tazobaktam 30/6 µg, seftazidim 10 µg, sefepim 30 µg, siprofloksasin 5 µg ve levofloksasin 5 µg) difüzyon yöntemiyle belirlenip EUCAST ve CLSI rehberlerine^{6,7} göre değerlendirilerek ko-transfer edilen (ortak aktarılan) antibiyotik dirençleri belirlendi.

Plazmit DNA İzolasyonu

Transkonjugantlardan plazmit DNA izolasyonu alkali lizis yöntemi ve küçük modifikasyonlar kullanılarak yapıldı¹⁰. Plazmit DNA moleküler belirteci olarak *Escherichia coli* V517 suşundan izole edilmiş plazmit DNA kullanıldı¹¹.

PCR Deneyleri

Polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] için izolatların toplam DNA'ları fenol-kloroform yöntemi ve küçük modifikasyonlarla elde edildi¹². Tüm DNA numuneleri -20 °C'de stoklandı. İzolatlar integraz genleri (*int1*, *int2*), integron değişken bölgeler (sınıf 1 için 5'CS-3'CS ve sınıf 2 için hep51-hep74), metalo-beta-laktamaz genleri (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* ve *bla_{OXA-48}*) ve biyofilm virülans genleri (*lasR* ve *rhIR*) taşıyıcılığı açısından tarandı. Metalo-beta-laktamaz genleri için pozitif kontroller olarak *Acinetobacter baumannii* BAK4 ve *A.baumannii* BAK40, integron genleri için *E.coli* ACC172 (sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif) kullanıldı¹³. PCR yönteminde kullanılan primer dizileri, reaksiyon şartları ve döngü parametreleri Tablo 1'deki referanslarda tarif edilmektedir.

Agaroz Jel Elektroforezi

Plazmit DNA'larının görüntülenmesi amacıyla plazmit DNA'lar etidyum bromür (0.5 µg/mL) eklenmiş %0.9'luk agaroz jele (Sigma, ABD) moleküler belirteç (*E.coli* V517)11 yüklenerek 40 volt doğru akımda üç saat yürütüldü. PCR ürünleri %1.5-2 agaroz jelde yürütüldü. Tüm DNA'lar jel dokümantasyon sisteminde (DNR Bio-Imaging System, İsrail) değerlendirildi.

Tablo 1. PCR Deneylerinde Kullanılan Primer Dizileri ve Özellikleri

Gen	Primer İsmi	Oligonükleotit Dizisi (5' → 3')	PCR Ürünü (bp)	Kaynak
<i>Int1</i> integraz	<i>Int1</i> F	F: GGT CAA GGA TCT GGA TTT GG	500	Machado ve ark., 2005 ¹⁴
	<i>Int1</i> R	R: ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC		
<i>Int2</i> integraz	<i>Int2</i> F	F: CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	740	Machado ve ark., 2005 ¹⁴
	<i>Int2</i> R	R: GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G		
Sınıf 1 integron değişken bölge	5'-CS	F: GGC ATC CAA GCA GCA AG	Değişken	Lévesque ve ark., 1995 ¹⁵
	3'-CS	R: AAG CAG ACT TGA CCT GA		
Sınıf 2 integron değişken bölge	Hep51	F: GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG	Değişken	White, 2000 ¹⁶
	Hep74	R: CCG GAT CCC GGA CCG ATG CAC GAT TTG TA		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC	F: CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798	Poirel et al., 2011 ¹⁷
	KPC	R: CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG	232	
<i>bla</i> _{NDM}	NDM	F: GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621	Poirel et al., 2011 ¹⁷
	NDM	R: CCG AAT GGC TCA TCA CGA TC		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP	F: GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	232	Poirel et al., 2011 ¹⁷
	IMP	R: GGT TTA AYA AAA CAA CCA CC		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM	F: GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390	Poirel et al., 2011 ¹⁷
	VIM	R: CGA ATG CGC AGC ACC AG		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48	F: GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438	Poirel et al., 2011 ¹⁷
	OXA-48	R: CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG		
<i>lasR</i>	<i>LasR</i>	F: AAG TGG AAA ATT GGA GTG GAG	130	Sabharwal, 2014 ¹⁸
	<i>LasR</i>	R: GTA GTT GCC GAC GAC GAT GAA G		
<i>rhlR</i>	<i>rhlR</i>	F: TGC ATT TTA TCG ATC AGG GC	133	Sabharwal, 2014 ¹⁸
	<i>rhlR</i>	R: CAC TTC CTT TTC CAG GAC G		

Bp: Baz çifti (base pair), Y: C veya T.

PU21 Transkonjugantlarının "Pulsed Field" Jel Elektrofrez Analizi

Muhtemel transkonjugant olduğu düşünülen izolatlara ait genomik DNA'lar Spel enzimiyle kesilerek CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belçika) elektrofrez cihazında, 200 V (6 volt/cm²)'ta 14 °C sıcaklık, 5 saniye başlangıç ve 20 saniye bitiş vuruş süresi olacak şekilde 18 saat süreyle yürütüldü. Elektrofrez sonrası 10 µL etidyum bromürle (Amresco, ABD) 20 dakika boyanan jel, UV transillüminatörle (Vilber Lourmat, Almanya) görüntüledi ve Tenover ve arkadaşları tarafından belirlenen ilkelere göre değerlendirildi¹⁹. Jel dokümantasyon sistemi (DNR Bio-Imaging System, İsrail) ile fotoğraflandı ve BioNumerics (AppliedMaths, Inc., Belçika, 6.01 versiyon) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

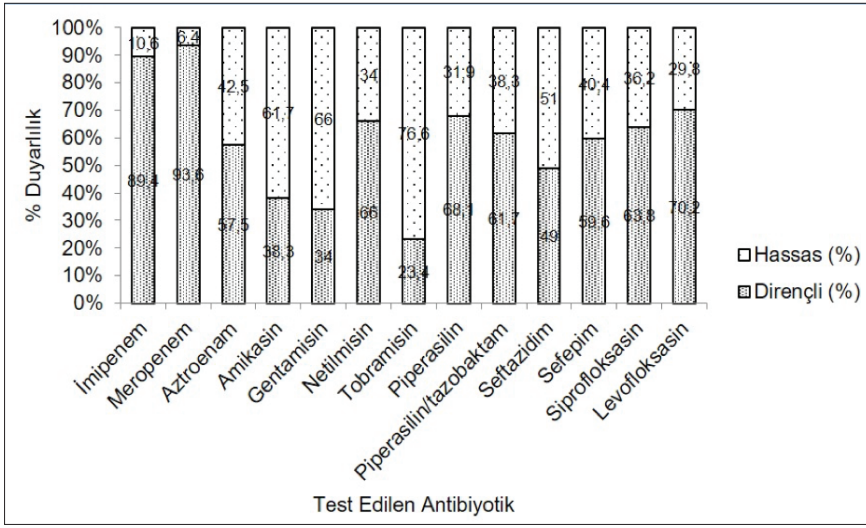
ERIC-PCR ile Klonal Benzerlik Analizi

'Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction' (ERIC-PCR)'lerde 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' ERIC1R ve 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' ERIC2 oligonükleotit primerleri kullanıldı²⁰. Kullanılan reaksiyon şartları, döngü parametreleri Ardakani ve Ranjbar'ın tanımladığı şekilde yapıldı²¹. Elde edilen, izolatlara ait bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak analiz edildi. Benzerlik hesaplamasında Dice korelasyon katsayısı, kümeleşme analizi için matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması [unweighthed pairwise grouping mathematical averaging (UPGMA)] yöntemi kullanıldı (optimizasyon 1.0, tolerans 1.0). Bant benzerlikleri %90'ın üzerinde olan izolatlar aynı klonda kabul edildi²².

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 47 izolatın 23 (%48.9)'ü servis, 15 (%31.9)'i poliklinik, dokuz (%19.2)'u yoğun bakım hastalarından izole edilmiştir. İzolatların 16 (%34.0)'sı balgam, 11 (%23.4)'i yara, dokuzu (%19.2) trakeal aspirat, dokuzu (%19.2) idrar, biri (%2.1) bronkoalveolar lavaj, biri (%2.1) dren sıvısı örneklerinden izole edilmiştir (Tablo II). Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre en yüksek direnç oranı meropenem (n= 44, %93.6), imipenem (n= 42, %89.4) ve levofloksasine (n= 33, %70.2), en düşük direnç oranı tobramisin (n= 11, %23.4), gentamisin (n= 16, %34.0) ve amikasin (n= 18, %38.3) karşı tespit edilmiştir (Şekil 1). Fenotipik tarama testi olarak kullanılan IMP/MEM-EDTA kombine disk yöntemine göre 25 (%53.2) izolatta MBL üretimi belirlenmiştir (Tablo II).

Tüm izolatların epidemiyolojik verileri Tablo II'de gösterilmektedir. PCR sonuçlarına göre izolatların %90'ının *lasR* ve *rhIR* biyofilm genleri açısından pozitif oldukları belirlenmiştir. Her iki biyofilm genini de taşımayan sekiz (%17) *P.aeruginosa* izolatu (KUP3, KUP36, KUP41, KUP50, KUP53, KUP59, KUP66 ve KUP68) saptanmıştır.



Şekil 1. Karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık oranları.

Altı izolatta (KUP7, KUP9, KUP20, KUP30, KUP54 ve KUP56) (%12.8) bla_{VIM} geni, beş izolatta (KUP41, KUP42, KUP47, KUP48 ve KUP57) (%10.6) bla_{NDM} geni, üç izolatta (KUP16, KUP21 ve KUP33) (%6.4) bla_{OXA-48} geni tespit edilmiştir. bla_{KPC} ve bla_{IMP} genleri tespit edilmemiştir.

İzolatların 39 (%82.9)'unda *intI1* integraz genine, 24 (%51)'ünde büyüklükleri $\geq 500-3000$ bp olan sınıf 1 integronlara rastlanmıştır (Tablo II). İntegraz genleri tespit edilip değişken bölgelerinde amplifikasyon gözlenmeyenler boş integron olarak değerlendirilmiştir (Tablo II). On iki transkonjugantın üçünde (PU21[pKUP24], PU21[pKUP32] ve PU21[pKUP66]) $\geq 500-3000$ bp aralığında sınıf 1 integronlar tespit edilmiştir. İzolatlarda sınıf 2 integron varlığına rastlanmamıştır. MBL geni tespit edilen 11 izolatin üç tanesinde (KUP7, KUP16 ve KUP57) fenotipik olarak MBL üretimi gözlenmiştir. Bu üç izolatin ikisinin bla_{VIM} geni, birinin bla_{NDM} geni taşıdığı saptanmıştır (Tablo II).

Replika ekimler sonucunda 12 (%25.5) *P.aeruginosa* PU21 transkonjugantı belirlenmiş, 10^{-6} ile 10^{-2} arasında olmak üzere konjugasyon etkinlikleri hesaplanmıştır (Tablo III). Transkonjugantların antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre ko-transfer edilen antibiyotik direnç paternleri Tablo III'te gösterilmiştir. Transkonjugantlarda, verici hücrelerinde (KUP33, KUP48, KUP54 ve KUP56) tespit edilmiş MBL genlerine rastlanmamıştır. İmipenem ve meropenem direnci taşıyan sadece bir transkonjugant (PU21 [pKUP32]) tespit edilmiştir (Tablo III). Konjugatif plazmit içeren iki izolatin (KUP54, KUP56) bla_{VIM} geni (%16.6), bir izolatin (KUP33) bla_{OXA-48} geni (%8.3) ve bir izolatin (KUP48) bla_{NDM} geni (%8.3) taşıdığı saptanmıştır (Tablo III).

Transkonjugantlardan alkali lizis yöntemiyle elde edilen plazmit DNA preparat örneklerinin agaroz jel elektroforezi Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P. aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri

<i>Pseudomonas</i> İzolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Paterni	MBL Test	<i>lasR/rfIR</i>	<i>bla_{YM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA48}</i>	<i>intI1</i> integraz Geni	İntegron Değişken Bölge
KUP1	Balgam	Kalp-Damar YBÜ	04.11.2021	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP2	TA	Yeni Doğan YBÜ	20.12.2021	IMP, MEM, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP3	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	23.12.2021	IMP, MEM, CN, NET, ATM, LEV	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP4	İdrar	Acil Polikliniği	22.12.2021	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP5	Yara	COVID-19 YBÜ	24.12.2021	IMP, MEM, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP6	Yara	Ortopedi Servisi	28.12.2021	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP7	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	06.01.2022	FEP, CIP, MEM, LEV, NET, TZP, CN	+	+/+	+	-	-	-	-	+	+
KUP9	İdrar	Acil Polikliniği	30.01.2022	IMP, MEM, CIP, LEV, NET	-	-/+	+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP10	TA	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	01.02.2022	AK, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri (devamı)

<i>Pseudomonas</i> İzolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Patemi	MBL Test	Isr/rfIR	<i>bla</i> _{YM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA48}	<i>int1</i> integraz Geni	İntegron Değişken Bölge
KUP11	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	01.02.2022	CIP, IMP, MEM, LEV, NET, PIP	-	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP13	Balgam	COVID-19 YBÜ	08.02.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, PIP, TZP	+	-/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP16	Balgam	Onkoloji Servisi	11.02.2022	AK, CN, FEP, MEM, CIP, TZP	+	-/+	-	-	-	-	+	+	+
KUP19	TA	Çocuk YBÜ	04.03.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, NET, PIP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP20	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	07.03.2022	ATM, FEP, CAZ, MEM, LEV, NET, PIP, TZP	-	+/+	+	-	-	-	-	+	+
KUP21	BAL	Cerrahi YBÜ	07.03.2022	ATM, FEP, CAZ, MEM, CIP, LEV, PIP, TZP	-	+/+	-	-	-	-	+	+	+
KUP22	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	09.03.2022	MEM	-	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP24	Balgam	Genel Cerrahi Servisi	18.03.2022	FEP, CIP, IMP, MEM, LEV, TZP, PIP, ATM	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP27	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	27.03.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri (devamı)

<i>Pseudomonas</i> İzolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Patemi	MBL Test	lasR/rhIR	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{RPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA48}</i>	<i>int1</i> İntegraz Geni	İntegron Değişken Bölge
KUP29	Balgam	Plastik Cerrahi Servisi	05.04.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP30	Balgam	Göğüs Cerrahi Servisi	08.04.2022	AK, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	+	-	-	-	-	+	+
KUP31	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	08.04.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP32	Balgam	Palyatif Onkoloji Servisi	09.04.2022	CIP, LEV, IMP, MEM	-	-/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP33	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	11.04.2022	IMP, MEM, NET, TOB	-	+/+	-	-	-	-	+	-	-
KUP34	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	11.04.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP35	TA	Romatoloji Servisi	11.04.2022	IMP, MEM	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP36	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	18.04.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri (devamı)

<i>Pseudomonas</i> izolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Paterni	MBL Test	lasR/ rhlR	bla _{IMP}	bla _{KPC}	bla _{NDM}	bla _{OXA48}	int/1 İntegraz Geni	İntegron Değişken Bölge
KUP38	Balgam	Dermatoloji Polikliniği	18.04.2022	CIP, IMP, LEV	+	+/+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP40	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	25.04.2022	IMP, MEM, TOB	-	+/+	-	-	-	-	-	-
KUP41	Yara	Kardiyoloji YBÜ	17.05.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	-	-/+	-	-	+	-	+	+
KUP42	İdrar	Acil Polikliniği	21.05.2022	IMP, MEM, NET	-	+/+	-	-	+	-	-	-
KUP43	Balgam	Acil Polikliniği	24.05.2022	AK, IMP, MEM, NET	-	+/+	-	-	-	-	+	+
KUP44	İdrar	Girişimsel Radyoloji Polikliniği	30.05.2022	CN, FEP, CIP, IMP, LEV, NET, TZP, PIP, TOB, MEM, AK	+	+/+	-	-	-	-	+	+
KUP47	Balgam	Hematoloji Servisi	01.06.2022	CN, ATM, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TOB	-	+/+	-	-	+	-	+	+
KUP48	TA	Çocuk YBÜ	08.06.2022	IMP, MEM, AK, NET, PIP, LEV	-	+/+	-	-	+	-	-	-
KUP49	TA	Çocuk Cerrahi Servisi	07.06.2022	IMP, MEM, PIP, TZP	-	+/+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP50	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	18.06.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	-	-/+	-	-	-	-	+	+

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri (devamı)

<i>Pseudomonas</i> İzolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Paterni	MBL Test	lasR/rhR	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA48}	<i>intI1</i> Integraz Geni	İntegron Değişken Bölge
KUP52	İdrar	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	20.06.2022	AK, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP53	İdrar	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	14.06.2022	CAZ, IMP, MEM, TZP,	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP54	Dren Sıvısı	Gastroenteroloji Servisi	20.06.2022	IMP, MEM, PIP, TZP, ATM, CAZ, CIP, FEP, LEV	-	+/+	+	-	-	-	+	+	Boş İntegron
KUP56	İdrar	Kalp-Damar YBÜ	28.06.2022	NET, IMP, MEM, CIP, LEV	-	+/+	+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP57	İdrar	Çocuk Nefroloji Polikliniği	28.06.2022	AK, CN, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	+	-	+	+
KUP58	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	21.07.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, PIP, TZP	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP59	Yara	Ortopedi Servisi	20.07.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP63	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	03.08.2022	IMP, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP66	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	28.08.2022	FEP, IMP, MEM, AK, TZP, PIP, ATM, CIP	-	-/-	-	-	-	-	-	+	+

Tablo II. Karbapenem Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Özellikleri (devamı)

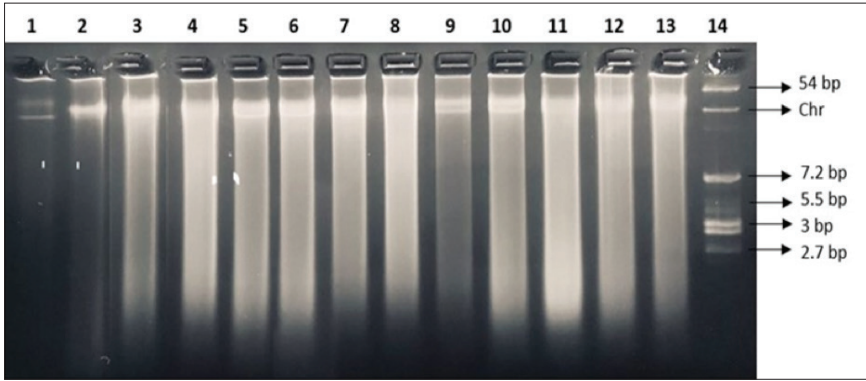
Pseudomonas İzolatu	Klinik Örnek	Hastane Ünitesi	İzolasyon Tarihi	Antibiyotik Direnç Paterni	MBL Test	lasR/rhIR	bla _{VIM}	bla _{IMP}	bla _{KPC}	bla _{NDM}	bla _{OXA48}	intl1	İntegron Değişken Bölge
KUP68	Yara	Dermatoloji Servisi	13.09.2022	IMP, PIP, CAZ, CIP, LEV, CN	+	-/-	-	-	-	-	-	+	+
KUP69	İdrar	Üroloji Servisi	13.09.2022	AK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+

TA: Trakeal aspirat, BAL: Bronkoalveolar lavaj, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, NET: Netilmisin, PIP: Piperasilin, TZP: Piperasilin-tazobaktam, ATM: Aztroenam, CAZ: Sefazidim, CIP: Siprofloksasin, FEP: Sefepim, LEV: Levofloksasin, TOB: Tobramisin.

Tablo III. Transkonjugantların Direnç Fenotipleri ve Ko-transfer Edilen Direnç

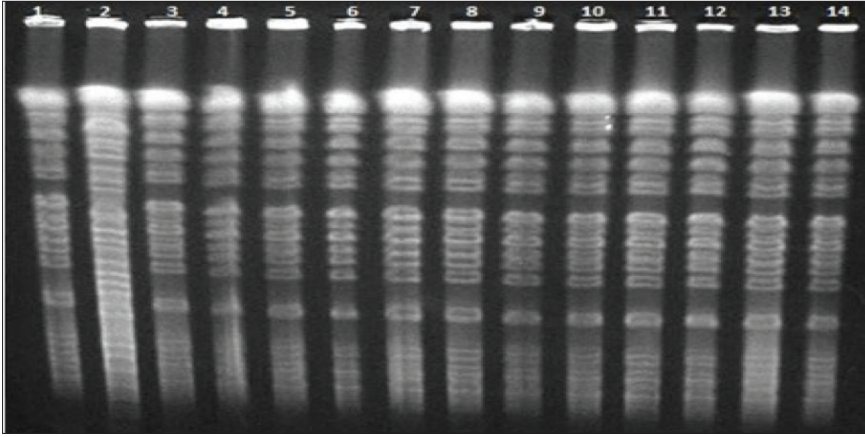
<i>Pseudomonas</i> İzolatı (MBL geni)	Direnç Fenotipi	PU21 Transkonjugantı	Ko-transfer Edilen Direnç	Konjugasyon Etkinliği
KUP2	CAZ, TZP	PU21 (pKUP2)	-	2.6×10^{-6}
KUP3	CAZ, TZP	PU21 (pKUP3)	-	3.2×10^{-5}
KUP24	ATM, FEP, CAZ, LEV, TZP	PU21 (pKUP24)	ATM, FEP, LEV, TZP	1.6×10^{-5}
KUP32	FEP, CAZ, IMP, MEM	PU21 (pKUP32)	IMP, MEM	3.3×10^{-5}
KUP33 (<i>bla</i> _{OXA48})	FEP, CAZ, LEV, TZP	PU21 (pKUP33)	-	6.6×10^{-4}
KUP38	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP38)	-	3.3×10^{-2}
KUP44	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP44)	FEP, TZP	1.2×10^{-4}
KUP48 (<i>bla</i> _{NDM})	FEP, CAZ, CIP, TZP	PU21 (pKUP48)	-	2×10^{-3}
KUP49	FEP, CAZ, CIP, NET, TZP	PU21 (pKUP49)	-	7×10^{-6}
KUP54 (<i>bla</i> _{VIM})	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP54)	FEP, CAZ, TZP	1.5×10^{-4}
KUP56 (<i>bla</i> _{VIM})	FEP, CAZ, CIP, LEV, TZP	PU21 (pKUP56)	CIP, LEV	$3,6 \times 10^{-4}$
KUP66	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP66)	FEP, TZP	8.3×10^{-2}
PU21	PIP	-	-	

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, NET: Netilmisin, PIP: Piperasilin, TZP: Piperasilin-tazobaktam, ATM: Aztroenam, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, FEP: Sefepim, LEV: Levofloksasin, TOB: Tobramisin.



Şekil 2. Transkonjugantlardan izole edilen plazmit DNA preparatlarının agaroz jel elektroforezi. 1: PU21(pKUP2); 2: PU21(pKUP3) 3: PU21(pKUP24); 4: PU21(pKUP32); 5: PU21(pKUP33); 6: PU21(pKUP38) 7: PU21(pKUP44); 8: PU21(pKUP48); 9: PU21 (pKUP49); 10: PU21(pKUP54); 11: PU21(pKUP56); 12: PU21(pKUP66); 13: PU21; 14: Plazmit moleküler marker (*E.coli* V517).

Fenotipik olarak replika ekimlerle (M9 minimal agarda üremeyen, seftazidim ve rifampisin plaklarında üreyen) gösterilen transkonjugantların PFGE analizi yapılarak bant profilleri değerlendirilmiş ve 12 transkonjugantın *P.aeruginosa* PU21 ile aynı bant profiline sahip olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3).



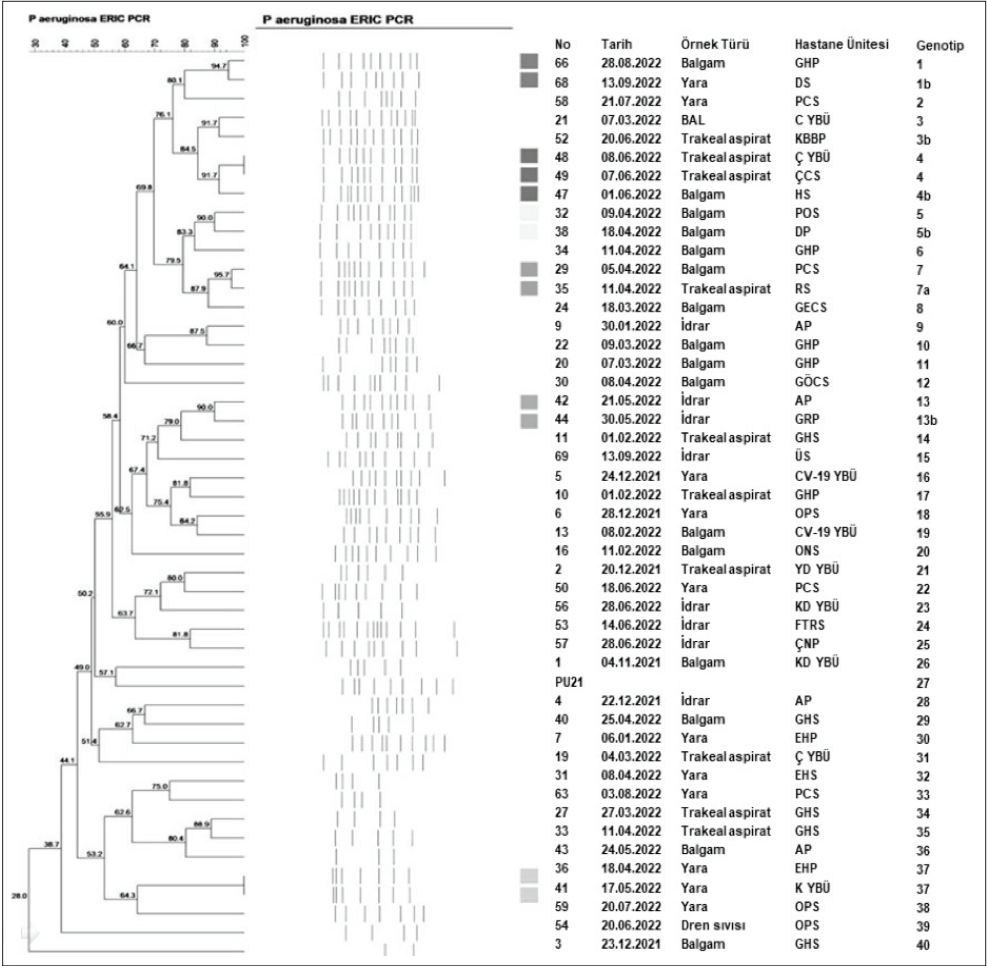
Şekil 3. *Pseudomonas aeruginosa* PU21 transkonjugantlarının PFGE görüntüsü. 1, *P.aeruginosa* PU21; 2, *P.aeruginosa* KUP2; 3, PU21 (pKUP2); 4, PU21 (pKUP3); 5, PU21 (pKUP2); 6, PU21 (pKUP24); 7, PU21 (pKUP32); 8, PU21 (pKUP33); 9, PU21 (pKUP44); 10, PU21 (pKUP48); 11, PU21 (pKUP49); 12, PU21 (pKUP54); 13, PU21 (pKUP56); 14, PU21 (pKUP66).

ERIC-PCR yöntemiyle genotiplendirilen 47 KDPA izolatu arasında klonal benzerlik araştırılmıştır. İzolatlar arasında 40 farklı genotip tespit edilmiş olup kümeleşme gösteren izolatlar yedi farklı küme içerisinde toplanmıştır (tolerans 1.0, optimizasyon 1.0, cutoff %90). 47 izolatuın 15'i herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup kümeleşme oranı %31.91 bulunmuştur. En büyük küme üç izolatuın (KUP 47, KUP 48, KUP 49) yer aldığı genotip 4 kümesi, ikinci en büyük küme ikişer izolatuın (KUP 66 ve KUP 68; KUP 21 ve KUP 52; KUP 32 ve KUP 38; KUP 29 ve KUP 35; KUP 42 ve KUP 44; KUP 36 ve KUP 41) yer aldığı genotip 1, 3, 5, 7, 13 ve 37 kümeleri olmuştur (Şekil 4). İzolatlar moleküler epidemiyolojik verileri açısından incelendiğinde, izolatlar arasında heterojen dağılım gözlenmiş ve baskın bir salgın klonu tespit edilmemiştir .

TARTIŞMA

Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı antibiyotik direncine neden olduğu ve bu durumun küresel bir halk sağlığı sorunu haline geldiği bilinmektedir. Klinik örneklerden izole edilen ve özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa* izolatlarının küresel risk raporuna göre antimikrobiyal dirence neden olan risk etkeni mikroorganizmalardan biri olduğu bildirilmiştir²³. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'ye göre çok ilaca dirençli olan *P.aeruginosa* ciddi tehditler kategorisinde yer almaktadır²⁴.

Bu çalışmadaki KDPA izolatlarının en dirençli bulunduğu diğer antibiyotikler levofloksasin, siprofloksasin ve piperasilin olarak belirlenmiştir. Ankara'da yapılan bir çalışmada antibiyotik direnç oranlarının bu çalışmayla uyumlu olduğu gözlenmiştir²⁵. Çin'de yapılan bir çalışmada en yüksek antibiyotik direnç oranları siprofloksasin (%51), levofloksasin (%48.4), aztroenam (%36.1) ve piperasiline (%29.0) karşı belirlenmiştir²⁶.



Şekil 4. Karbapenem dirençli 47 *P.aeruginosa* KUP izolatlarının ERIC-PCR paternlerinin dendrogram analizi ve epidemiyolojik verileri.

BAL: Bronkoalveolar lavaj, GHP: Göğüs hastalıkları polikliniği, DS: Dermatoloji servisi, PCS: Plastik cerrahi servisi, C YBÜ: Cerrahi yoğun bakım ünitesi, KBBP: Kulak burun boğaz polikliniği, Ç YBÜ: Çocuk yoğun bakım ünitesi, ÇCS: Çocuk cerrahi servisi, HS: Hematoloji servisi, POS: Palyatif onkoloji servisi, DP: Dermatoloji polikliniği, PCS: Plastik cerrahi servisi, RS: Romatoloji servisi, GECS: Genel cerrahi servisi, AP: Acil polikliniği, GÖCS: Göğüs cerrahi servisi, GRP: Girişimsel radyoloji polikliniği, GHS: Göğüs hastalıkları servisi, ÜS: Üroloji servisi, CV-19 YBÜ: COVID-19 yoğun bakım ünitesi, OPS: Ortopedi servisi, ONS: Onkoloji servisi, YD YBÜ: Yenidoğan yoğun bakım ünitesi, KD YBÜ: Kalp-damar yoğun bakım ünitesi, FTRS: Fizik tedavi ve rehabilitasyon servisi, ÇNP: Çocuk nefroloji polikliniği, EHP: Enfeksiyon hastalıkları polikliniği, EHS: Enfeksiyon hastalıkları servisi, K YBÜ: Kardiyoloji yoğun bakım ünitesi.

Bu çalışmadaki direnç oranının yukarıda bahsedilen çalışmalara oranla yüksek olmasının nedeninin seçilen izolat kümesinin %80'den fazlasının servis ve yoğun bakım hastalarına ait örneklerden izole edilmiş olması olabilir.

Avrupa'da 1990'lı yıllarda keşfedilen ve dirence neden olan karbapenemazlar günümüzde ciddi oranda artış göstermektedir. Genellikle plazmit aracılı aktarılan karbapenemazlardan sıklıkla *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IPM}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} tipleri bildirilmektedir^{27,28}. Bu enzimler özellikle Enterobacterales üyeleri, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii*'de tanımlanmıştır. Karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının yayılımını önlemek için karbapenemaz kodlayan genlerin moleküler yöntemlerle araştırılarak takibi kritik bir öneme sahiptir²⁹.

Bu çalışmada karbapenem dirençli 47 *P.aeruginosa* izolatında *bla*_{KPC}, *bla*_{IPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{OXA-48} genleri PCR yöntemiyle taranmıştır. Fakat konjugasyon deneylerinde hiçbirinin plazmit aracılı olmadığı, genlerin kromozomda taşındığı tespit edilmiştir. İzolatlarda birden fazla karbapenemaz genine rastlanmamıştır. Ülkemizde Hoşbul ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada KDPA izolatlarında *bla*_{VIM} geninin pozitif bulunması bu çalışmada elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir³⁰. Dünya çapında yapılan çalışmalarda ise özellikle *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} gen sıklığı açısından benzerlikler mevcuttur^{31,32}. İzolatlarda karbapenem direnç genlerinin düşük oranda tespit edilmesinin nedeninin, diğerlerinin porin kaybı ve eflüks pompalarının ekspresyonundaki artış gibi mekanizmalara bağlı olabileceği düşünülmüştür. Değişken direnç profili sergileyen *P.aeruginosa* izolatlarının araştırılan metalo-beta-laktamazlardan başka diğer enzimlere de sahip olabileceği bildirilmiştir³³.

Bu çalışmada izolatların 25 (%53.2)'inde fenotipik olarak MBL üretimi tespit edilmiş olup bulgular Mısır'da yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir³⁴. MBL geni tespit edilen 11 izolatın üçünde (%27.3) fenotipik olarak MBL üretimi gözlenmiştir. Fenotipik olarak MBL üretimi saptanan izolatlarda taranan direnç genlerinden hiçbirine rastlanmamış olmasının AmpC-tipi beta-laktamaz ekspresyonu gibi diğer direnç mekanizmalarının ve C sınıfı beta-laktamazların varlığının araştırılmamasından kaynaklandığı düşünülebilir³⁵. Ayrıca antibiyotik gradiyent test ve IMP-EDTA disk yöntemlerinde meydana gelen pozitifliğin, MBL enzimideki çinko iyonlarının EDTA ile şelasyon yaparak MBL aktivitesinin etkisiz hale getirilmesinden çok mikroorganizmaların EDTA'ya duyarlılıkları nedeniyle oluştuğuna dair görüşler bildirilmiştir. EDTA bakteriyel hücre duvarı geçirgenliğini arttırabilme özelliğine sahiptir ve buna bağlı olarak *P.aeruginosa*'nın OprD ekspresyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak MBL aktivitesinin fenotipik olarak araştırılmasında kombine disk yönteminin yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği vurgulanmıştır³⁶.

Virülans faktörlerini ve biyofilm oluşumunu yöneten "quorum sensing (QS)" sistemlerine sahip bakterilerin tedavide kullanılan karbapenemlere ve yeni nesil antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. *P.aeruginosa*'nın antibiyotik direnç mekanizmalarına ek olarak biyofilm üretebilmesi ve konakçı immün sisteminden kaçabilme yeteneği, neden olduğu enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Bakteriler hücreler arası iletişimi sağlamak için küçük sinyal moleküllerini (otoindükleyiciler, AI'ler) salgılamaktadır. Bu iletişim sistemi çekirdek algılama olarak adlandırılır. Her sistem *las* ve *rhl* genleri tarafından düzenlenir: AI sentezi (*lasI* ve *rhlI* genleri) ve bunların aynı kökenli transkripsiyonel aktive edici proteini (*lasR* ve *rhlR*). *P.aeruginosa*'nın elastaz (*lasB*), toksin A (*toxA*) ve alkalın pro-

teaz (*aprA*) gibi bazı virülans faktörlerini kodlayan genler, *las* ve *rhl* sentez genleri (*lasI*/*lasR* ve *rhlI*/*rhlR*) tarafından yönetilir⁴. Mevcut çalışmada izolatların 34 (%72.3)'ünde *lasR*, 39 (%83)'unda *rhlR* genlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın kısıtlılığı olarak değerlendirebileceğimiz bir nokta da *pslA*, *pelA* ve *ppyR* gibi diğer virülans genleri açısından izolatların taranmamasıdır^{37,38}. Bu çalışma, izolatların virülansından çok bazı karbapenemez genleri içeren ve içermeyen KDPA izolatlarının moleküler epidemiyolojik analizine odaklanmaktadır. Ülkemizde İzmir'de yapılan bir çalışmada ise farklı kliniklerinden izole edilen 83 *P.aeruginosa* izolatında biyofilmle ilişkili olabileceği düşünülen "quorum sensing" genleri *lasI*, *lasR*, *rhlR* sırasıyla 17, 18, 13 izolatta saptanırken, *rhlI*'nin tüm kökenlerde pozitif olduğu belirlenmiştir³⁹. Ülkemizde 50 farklı *P.aeruginosa* izolatıyla yapılan bir başka çalışmada "quorum sensing" üretiminden sorumlu olan (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*) genlerin taranması ve bu genlerin bazı virülans faktörlerinin (elastaz, pyosiyinin, biyofilm oluşumu, kayma hareketi) üretimiyle kıyaslanması amaçlanmıştır. PCR analizi sonucunda 46 izolatta tüm genler pozitif bulunmuş olup dört izolatta *lasR* tespit edilememiştir. Çalışmada "quorum sensing" genlerinin bulunmaması veya mutasyon varlığı durumlarında virülans faktörlerinin üretiminde azalma tespit edilmiştir ancak bu durumun izolatların enfeksiyon oluşturmalarını engellemediği belirtilmiştir⁴⁰.

bla_{VIM}, *bla_{NDM}* ve *bla_{OXA-48}* karbapenemaz genlerinin tespit edildiği 14 izolatın 13 (%93)'ünde QS genlerine rastlanmıştır. Sınıf 1 integron varlığı gözlenen 33 izolatın 27 (81.8)'sinde QS genleri tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre karbapenemaz geni, sınıf 1 integron ve QS geni barındıran izolatların çoklu direnç mekanizmalarına sahip olmasının enfeksiyon hastalıklarının patogeneğinde ve hastalık seyrinde önemli olabileceği düşünülebilir. Bulgular Güney Hindistan ve Kastamonu'da yapılan çalışmalara ait sonuçlarla uyumluluk göstermektedir^{41,4}. Tüm izolatların sekizinde (%17) *lasR* ve *rhlR* genlerinin varlığına rastlanmamış olması virülans genlerinin farklı QS sistemleri tarafından kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. Virülans genleriyle ilgili yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa*'nın mükemmel evrimsel yeteneğine bağlı olarak gelişen çevresel adaptasyon sürecinde henüz tespit edilememiş ve tanımlanamamış QS sistemlerini de barındırabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Antibiyotik direnci ve virülans genleri arasındaki ilişki, belirsizliğini korumakta ve buna bağlı olarak daha fazla araştırma ve çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır⁴².

Karbapenem direncinin yayılmasında önemli mobil genetik elemanlardan olan plazmitler konjugasyon yoluyla direnç genlerinin aktarımında kilit rol oynamaktadır. Plazmit aracılı karbapenemaz genlerinin, farklı suşlar ve türler arasında hızla yayılma potansiyeli oldukça riskli bir durumdur⁴³. Çin'de yapılan bir çalışmada *bla_{KPC-2}* geni taşıyan plazmit varlığı bildirilmiştir⁴⁴. Bu çalışmada konjugasyon deneyleri sonucunda 12 izolatın bazı antibiyotik dirençlerinin ko-transfer edildiği gözlenmiştir. Bulgular Hindistan'da yapılan bir çalışma ile uyumluluk göstermektedir⁴⁵. Fakat tespit ettiğimiz karbapenemaz genleri seftazidim seleksiyonuyla elde edilen transkonjugantlarda gözlenmemiştir. Tablo II'de de görüldüğü gibi bir KDPA izolatının (KUP32) transkonjugantı (PU21 [pKUP32]) imipenem ve meropenem dirençli tespit edilmesine rağmen taranan beş MBL genine rastlanmamıştır.

Bu izolatta konjugatif plazmitte bulunan farklı bir MBL geni olduğu düşünülebilir. Bu durum bize verici hücrelerdeki karbapenemaz genlerinin kromozomal lokasyonda olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada Şekil 3'te de görüldüğü gibi transkonjugantların plazmit DNA izolasyon preparatlarının agaroz jel elektroforezinde konjugatif plazmit bantları açıkça gözlenmemiştir (PU21 [pKUP2 hariç]). Bu durum büyük moleküler ağırlıklı konjugatif plazmit DNA'ların (≥ 200 kbp) izolasyon prosedürü sırasında kromozomal DNA ile birlikte denatüre olarak kaybedilmesinden kaynaklanabilir. Bu yüzden, antibiyotik duyarlılıkları açısından farklılık gösteren bu transkonjugantların genotipik açıdan *P.aeruginosa* PU21 transkonjugantları olduğunun doğrulanması için bakteriyel tiplendirmede altın standart olan PFGE yöntemi kullanılmıştır (Tablo III)⁴⁶. Jeldeki transkonjugant bant paternlerinin PU21 ile aynı, klinik izolatınkinden (KUP2) farklı olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 3).

Karbapenem direncinin yayılmasında rol oynayan mobil genetik elemanlarla ilgili Uganda'da yapılan bir çalışmada da *bla*_{VIM} geninin sınıf 1 integronlarla birlikte bulunduğu bildirilmiştir⁴⁷. Konjugatif direnç plazmit varlığının gözlemlendiği 11 izolatta sınıf 1 integron varlığına da rastlanmıştır. Bu da integronların plazmit üzerinde taşındığını düşündürmüştür.

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ERIC-PCR yöntemiyle araştırıldığı bu çalışmada dendrogram analizi sonucunda yedi küme tanımlanmıştır. İzolatlar arasındaki kümeleşme oranı %31.91 olarak belirlenmiştir. En büyük kümede üç izolatın yer aldığı ve baskın bir salgın klonunun tespit edilmediği gözlenmiştir. Bu kadar farklı genotipteki bakteri klonlarının bir hastanede tespit edilmesi gelecekte salgın yapma potansiyelindeki klonların da fazla olduğunu düşündürmektedir. Çok merkezli yürütülen bir çalışmada 37 adet karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatu arasındaki klonal ilişki ERIC-PCR yöntemiyle araştırılmış ve hastane kaynaklı yedi küme tanımlanmıştır. Dört farklı hastaneden izole edilen 30 izolatın tek büyük bir klona ait olduğu gözlenmiştir. Klonun *bla*_{VIM} ve *bla*_{GES} barındırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar belirgin bir klonal yayılımın varlığına dikkat çekmiştir³³. Bu çalışmada 47 izolatın ERIC-PCR analizinde üç izolatın (KUP47, KUP48, KUP49) yer aldığı bir klonda (genotip 4) iki izolatın (KUP47, KUP48) *bla*_{NDM} geni taşıdığı gözlenmiştir. Bu izolatlara ait örneklerin izole edildiği tarihler arasında yakınlık bulunmaktadır (Şekil 4). Örneklerin gönderildiği birimler birbiriyle yakın ilişkili olduğundan epidemik bir klon varlığından bahsedilebilir.

Sonuç olarak, karbapenem grubu antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere karşı yüksek oranda dirençli oldukları gözlenenmiş çalışma izolatlarının bazılarında konjugatif plazmitlerle ko-transfer edilen antibiyotik direnci tespit edilmiştir. Aynı zamanda izolatlarda integron gen kasetlerine de rastlanması, bu suşların çevresel adaptasyon sağlayabilmek için mobil genlerini yakın ve akraba bakteri türleriyle paylaşabilme potansiyelinde olduklarını düşündürmektedir. Antibiyotiklere karşı direnç kodlayan mobil genetik elemanların evrimsel adaptasyonlara katkısının moleküler epidemiyolojik analizlerinin ve takibinin, direnç gelişiminin kontrol altına alınması için yapılacak ulusal ve uluslararası düzeydeki çalışmalara ve veri tabanlarına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 24/03/2022 Karar No: 2022/06.06).

TEŞEKKÜR

Laboratuvar kullanımı ve klinik izolatların temini için Prof. Dr. Devrim Dünder'a, dendrogram analizinin yapılmasına katkı sağladıkları için Prof. Dr. Barış Otlu ve Dr. Elif Seren Tanrıverdi'ye teşekkür ederiz. Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (TDK-2022-1374).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Çeken N, Duran H, Atik B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının dört yıllık direnç profili. Pam Med J 2021; 14: 306-11. <https://doi.org/10.31362/patd.789332>
2. Lopez-Garcia A, Rocha Gracia RC, Bello Lopez E, Juarez Zelocualtealt C, Saenz Y, Castaneda Lucio M, et al. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. Infect Drug Resist 2018; 11: 1523-36. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173455>
3. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. Emerg Microbes Infect 2022; 11(1): 811-14. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972>
4. Başkan C, Sırken B, Tüfekci EF, Kılıç Ç, Ertürk Ö, Erol İ. Presence of quorum sensing system, virulence genes, biofilm formation and relationship among them and class 1 integron in carbapenem-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Arch Microbiol 2022; 204(8): 464. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03061-y>
5. Roy D, Huguet KT, Grenier F, Burrus V. IncC conjugative plasmid sand SXT/R391 element srepairdouble-strand breaks caused by CRISPR-Cas during conjugation. Nucleic Acids Res 2020; 48(16): 8815-27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa518>
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available from: <http://www.eucast.org>.
7. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
8. Öcal D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. Ankem Derg 2012; 26 (3): 154-64. <https://doi.org/10.5222/ankem.2012.154>
9. Jacoby GA. Properties of R plasmids determining gentamicin resistance by acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6(3): 239-52. <https://doi.org/10.1128/AAC.6.3.239>
10. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145(3): 1365-73. <https://doi.org/10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981>
11. Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid 1978; 1(3): 417-20. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(78\)90056-2](https://doi.org/10.1016/0147-619X(78)90056-2)
12. Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Res 1993; 21(9): 2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>
13. Copur Cicek A, Ozgumus OB, Saral A, Sandalli C. Antimicrobial resistance patterns and integron carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey. Ann Lab Med 2014; 34(2): 139-44. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.2.139>

14. Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(5): 1823-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005>
15. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 185-91. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185>
16. White PA, McIver CJ, Deng Y, Rawlinson WD. Characterisation of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 182(2): 265-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08906.x>
17. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70(1): 119-23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
18. 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): 125-34.
19. Durmaz R, Otlu B, Koksall F. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 372-7. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2009.372>
20. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(24): 6823-31. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
21. Ardakani MA, Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electron Physician* 2016; 8(4): 2291-6. <https://doi.org/10.19082/2291>
22. Menekşe Ş, Tanrıverdi ES, Oğuş H, Altınay E, Kaya Ç, Çağlayan E, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* outbreak with a commercial blood gas injector as the culprit and interventions for source and prevention: A possible passage between patient and ECMO water heater device. *Am J Infect Control* 2023; 51(5): 533-38. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.07.012>
23. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Characterization of the pJB12 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* reveals Tn6352, a novel putative transposon associated with mobilization of the *bla*_{VIM-2}-harboring In58 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(5): e02532-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02532-16>
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antimicrobial resistance threats report, 2019. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>.
25. Mirza HC, İnce Ceviz G. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı sefiderokol, imipenem/relebaktam ve diğer antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2022; 79(3), 433-42. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2022.79095>
26. Qin J, Zou C, Tao J, Wei T, Yan L, Zhang Y, et al. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in elderly patients: Antimicrobial resistance profiles, risk factors and impact on clinical outcomes. *Infect Drug Resist* 2022; 15: 2301-14. <https://doi.org/10.2147/IDR.S358778>
27. 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: 152-60. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.011>
28. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. European network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5): 413-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
29. Vallabhaneni S, Huang JY, Grass JE, Bhatnagar A, Sabour S, Lutgring JD, et al. Antimicrobial susceptibility profiles to predict the presence of carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol* 2021; 59(6): e02874-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02874-20>
30. 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. *J Ist Faculty Med* 2020; 85(3): 355-61.
31. Diorio-Toth L, Irum S, Potter RF, Wallace MA, Arslan M, Munir T, et al. Genomic surveillance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates reveals an additive effect of carbapenemase production on carbapenem resistance. *Microbiol Spectr* 2022; 10(3): e0076622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00766-22>

32. Ali DO, Nagla MM. Molecular detection of *bla*_{OXA-48} gene encoding carbapenem resistance *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Khartoum State Hospitals, Sudan. medRxiv 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20137034>
33. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D, Akkawi C, Nabi A, AlSharhan MA, AlDeesi ZO, et al. Role of outer membrane permeability, efflux mechanism, and carbapenemases in carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* from Dubai hospitals: Results of the first cross-sectional survey. *Int J Infect Dis* 2019; 84: 143-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.027>
34. 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: 3455-61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S222329>
35. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldi O, Aydoğan S, 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. <https://doi.org/10.3855/jidc.9486>
36. Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(4): 340-1. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.004>
37. Ghadaksaz A, Imani Fooladi AA, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *J App Biomed* 2015; 13(1): 61-8. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2014.05.002>
38. Malaş İren H. Kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm ve TİP-3 sekresyon sistemi arasındaki ilişkinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2022.
39. Uzunbayır Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, Öztürk İ, Ökeer M, Aydemir SŞ, et al. The virulence characteristics and epidemiological relationship of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Turk Bull Hyg Experiment Biol* 2019; 76(4): 395-404. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.68235>
40. Önem E. *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında virülans faktörlerinin araştırılması ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin pulsed field jel elektroforez yöntemiyle belirlenmesi. TÜBİTAK Program Kodu: 3001, Proje No: 216S663, 2018.
41. Ellappan K, Belgode Narasimha H, Kumar S. Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital in South India. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 12: 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.08.018>
42. Miranda SW, Asfahl KL, Dandekar AA, Greenberg EP. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Adv Exp Med Biol* 2022; 1386: 95-115. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_4
43. Hu YY, Wang Q, Sun QL, Chen GX, Zhang R. A novel plasmid carrying carbapenem-resistant gene *bla*_{KPC-2} in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 1285-88. <https://doi.org/10.2147/IDR.S196390>
44. Dai X, Zhou D, Xiong W, Feng J, Luo W, Luo G, et al. The IncP-6 plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* carries a novel ΔISEc33-associated *bla*_{KPC-2} gene cluster. *Front Microbiol* 2016; 7: 310. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00310>
45. Paul D, Chanda DD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. An insight into analysis and elimination of plasmids encoding metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 21: 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.002>
46. Neoh HM, 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
47. Aruhomukama D, Najjuka CF, Kajumbula H, Okee M, Mboowa G, Sserwadda I, et al. *bla*_{VIM} and *bla*_{OXA}-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): 853. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4510-5>