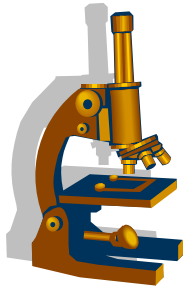




Yoğun Bakım Ünitesinde Nozokomiyal Alt Solunum Yolu İnfeksiyon Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Antimikrobiyal Direnç Genleri



Yrd.Doç.Dr.Burçin Özer

Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakóltesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Yoğun Bakım Ünitesinde Nozokomiyal Alt Solunum Yolu İnfeksiyon Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Antimikrobiyal Direnç Genleri

Burçin Özer^{*}, Nizami Duran^{*}, Yusuf Önlü^{**}, Lütfü Savaş^{*}

^{*} Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

^{**} Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Hatay

**Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma Fonu
(BAP 08 T 1701 nolu proje) tarafından desteklenmiştir**

Giriş

❖ YBÜ'deki yüksek infeksiyon hızı

- Çok sayıda ve geniş spektrumlu antibiyotik
- Antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar
- Antibiyotik tedavisinde ciddi problemler

❖ *P. aeruginosa* nozokomiyal infeksiyonlarda en önemli bakterilerden biridir

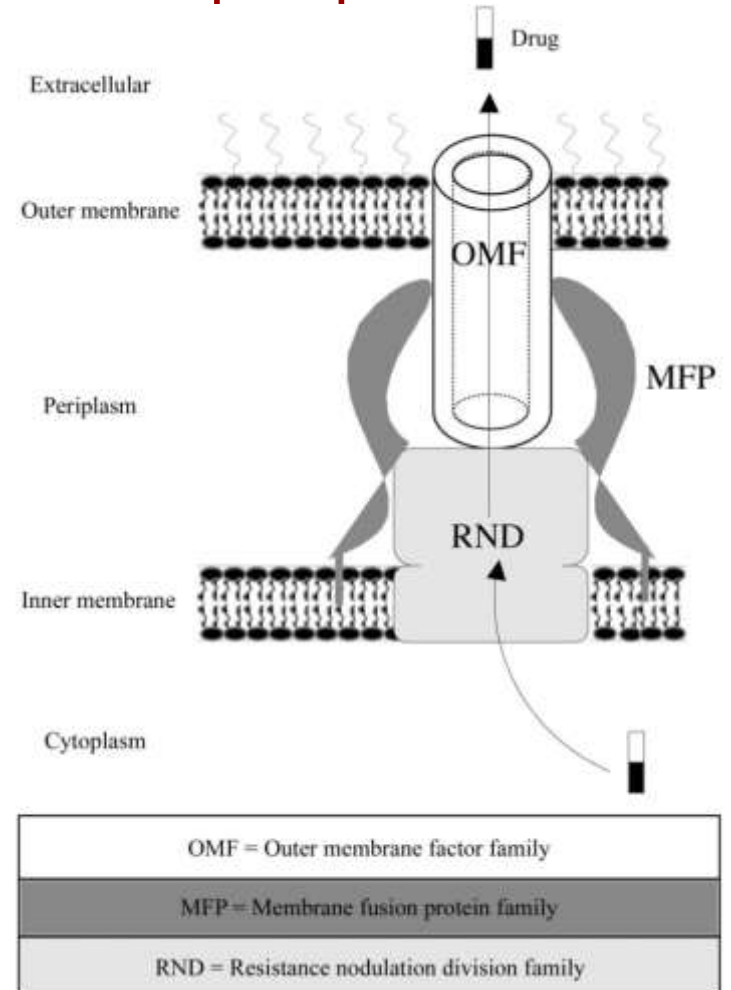
❖ Özellikle yoğun bakım ünitesinde kazanılan nozokomiyal alt solunum yolu infeksiyonlarında önemli bir patojendir

Direnç Mekanizmaları

❖ Antimikrobiyal ajanlara karşı bir çok mekanizma ile direnç geliştirirler

- İnaktive eden enzimlerin üretimi
- Hedef enzimlerin mutasyonları
- Çoklu ilaç eflüks pompaları
 - Dış membran faktör ailesi (OMF)
 - Direnç nodül hücresi üst ailesi (RND)
 - Membran füzyon protein ailesi (MFP)

Çoklu ilaç eflüks pompaları



Direnç nodül hücresi üst ailesine (RND) ait eflüks sistemleri

❖ **mexAB-oprM;**

- Florokinolonlar
- Tetrasiklinler
- Kloramfenikol
- Beta-laktamlar
(karbenisilin, piperasilin, seftazidim, sefepim, aztreonam ve meropenem)

❖ **mexCD-oprJ;**

- Florokinolonlar
- Antipseudomonal beta-laktamlar (piperasilin, sefepim ve meropenem)

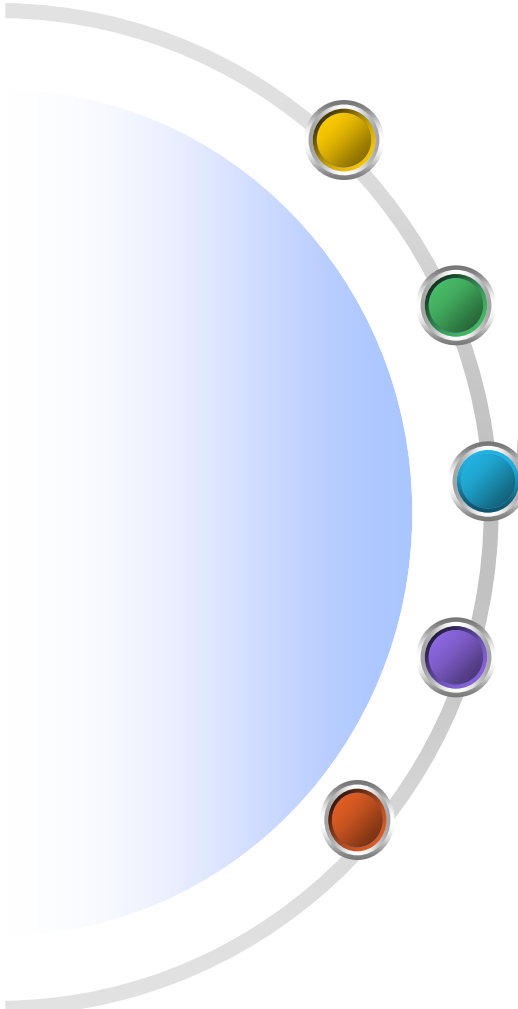
❖ **mexEF-oprN;**

- Florokinolonlar
- Trimetoprim
- Kloramfenikol

❖ **mexXY-oprM;**

- Florokinolonlar
- Aminoglikozidler
- Bazı beta laktamlar
(piperasilin, sefepim, seftazidim, meropenem, veya imipenem)

AMAÇ



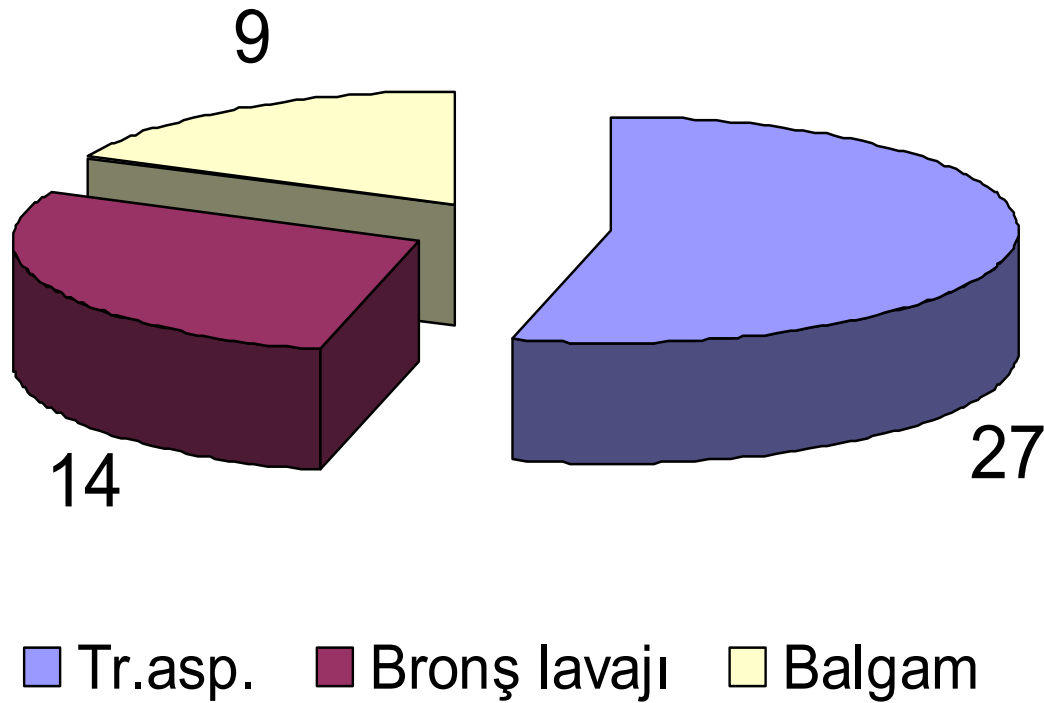
**Yoğun bakım ünitesinde kazanılan
nozokomiyal alt solunum yolu
enfeksiyonlarında izole edilen
P. aeruginosa kökenlerinin
antimikrobiyal direnç genlerinin
saptanması amaçlandı.**

Gereç ve Yöntem

- ❖ Şubat 2007-Nisan 2009 tarihleri arasında
- ❖ Mustafa Kemal Üniversite Hastanesi yoğun bakım ünitesindeki hastalardan
- ❖ Nozokomiyal alt solunum yolu infeksiyon etkeni
- ❖ 50 *P. aeruginosa* kökeni çalışmaya dahil edildi.

P. aeruginosa kökenleri

❖ 50 *P.aeruginosa* kökeni



Disk Difüzyon

- ❖ Mezlosilin (75 µg),
- ❖ Piperasilin/tazobaktam (100/10 µg),
- ❖ Seftazidim (30 µg),
- ❖ Sefepim (30 µg),
- ❖ İmipenem (10 µg),
- ❖ Meropenem (10 µg),
- ❖ Gentamisin (10 µg),
- ❖ Amikasin (30 µg),
- ❖ Tobramisin (10 µg),
- ❖ Siprofloksasin (5 µg),
- ❖ Norfloksasin (10 µg) (Oxoid, İngiltere)
- ❖ Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne (CLSI, 2010) göre değerlendirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

- ❖ DNA ekstraksiyonu Kado ve Liu'nun yöntemi modifiye edilerek yapıldı.
- ❖ Primerler Dumas ve ark. makalesine göre belirlendi.

Kado & Liu. *J Bacteriol* 1981

Dumas et al. *FEMS Microbiol Lett*, 2006

Primerler

Genler	(Primerler) 5' → 3'	Ürün boyutu (bp)
mexA1	CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC	316
mexA2	GGAGACCTTCGCCGCGTTGTGCG	
mexC1	ATCCGGCACCGCTGAAGGCTGCG	344
mexC2	CGGATCGAGCTGCTGGATGCGCG	
mexC3	GTACCGGCGTCATGCAGGGTTC	164
mexC4	TTACTGTTGCGGCGCAGGTGACT	
mexE4	CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC	114
mexE5	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC	
mexR1	CGCGAGCTGGAGGGAAGAAACC	150
mexR2	CGGGGCAAACAACCTCGTCATGC	
mexT1	CAGCACCGCGGTGTTCCGCATCG	216
mexT2	ACGGTCTTGCGCTTGCGGTTGGC	
mexX1	TGAAGGCGGCCCTGGACATCAGC	326
mexX2	GATCTGCTCGACGCGGGTCAGCG	

Genler	(Primerler) 5' → 3'	Ürün boyutu (bp)
ampC1	CGGCTCGGTGAGCAAGACCTTC	218
ampC2	AGTCGCGGATCTGTGCCTGGTC	
oprD1	ATCTACCGCACAAACGATGAAGG	156
oprD2	GCCGAAGCCGATATAATCAAACG	
oprD3	CTCGACGGCACCTCCGACAAGAC	232
oprD4	AGCCCTTCGAATTCGCTGCTCTG	
oprJ1	GTTCCGGGCCTGAATGCCGCTGC	305
oprJ2	TCGCGGCTGACCAGGGTCTGACG	
oprN1	CAACCGGGAGTGACCGAGGACCG	235
oprN2	TGCTCAGGGCAATCTTCTCGCGC	
nfxB1	CGCCTGATCAAGGAACACCTCACC	164
nfxB2	CGAAACACGCCTTTCTGCTGTCC	

Multipleks PZR

- ❖ **Ürün boyutunu belirleyebilmek için 100-2000 kb arasında fragmanlar içeren DNA markeri kullanıldı.**
 - 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç.
- ❖ **PZR işlemi Biorad/Thermal Blocks xp cyclers (Tokyo Japan) cihazında gerçekleştirildi.**
- ❖ **Dört farklı Multipleks PZR grubu oluşturuldu.**

Multipleks PZR Grupları

1

mexE (114 bç)
mexR (150 bç)
mexT (216 bç)
MexA (316 bç)

2

oprD (156 bç)
oprD (232 bç)
oprJ (305 bç)

3

mexC (164 bç)
mexC (218 bç)
ampC (344 bç)

4

nfxB (164 bç)
oprN (235 bç)
mexX (326 bç)

Multipleks PZR

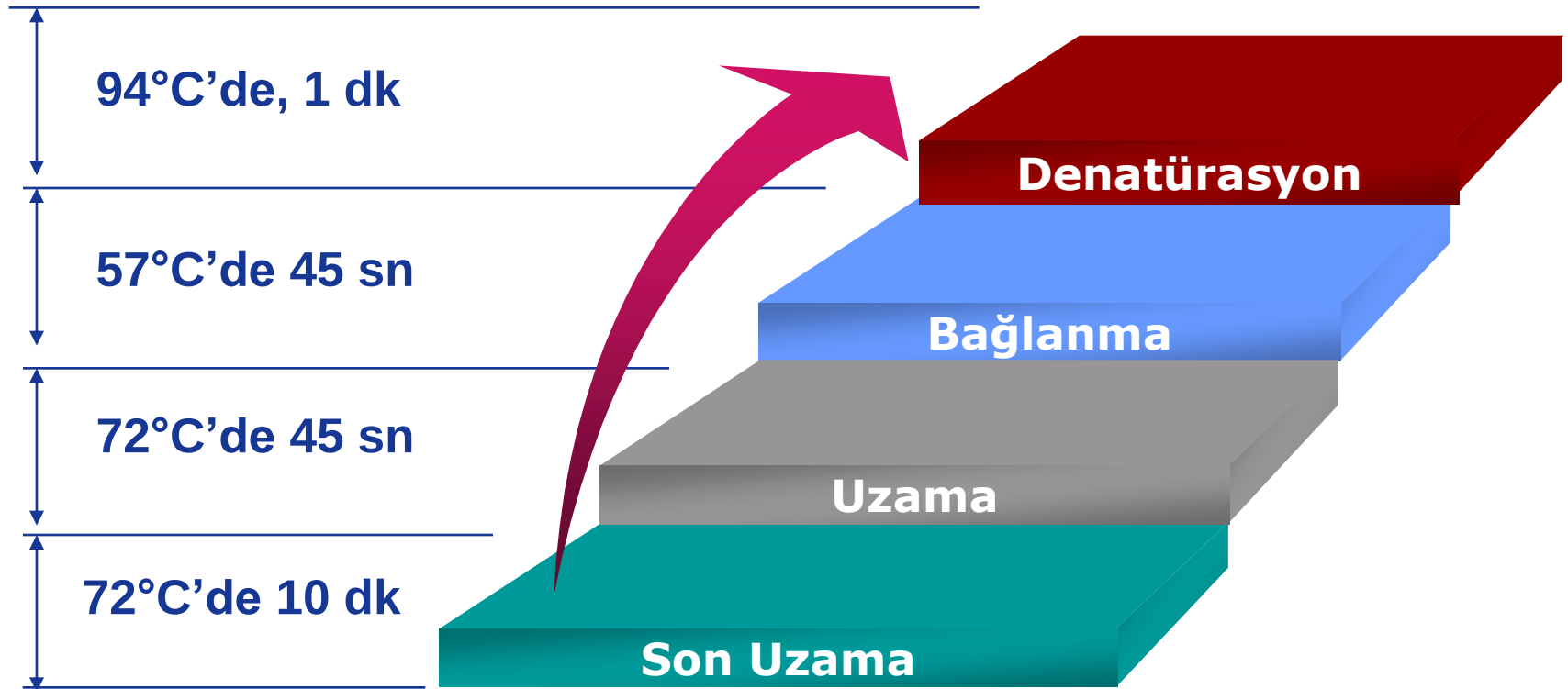
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

❖ Toplam 25 μ l'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına

- 2.5 μ l 10X PZR tamponu
- Deoksinükleotidlerin her birinden 200 μ M (AB Gene, İngiltere)
- 2 mM $MgCl_2$
- 0.4 μ M primerler
- 10 ng kalıp DNA
- Distile su

❖ 1 U Taq polimeraz (Fermentas, USA) eklendi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)



(mexA, mexT, mexE, mexR genleri için)
Toplam 35 PZR siklusu

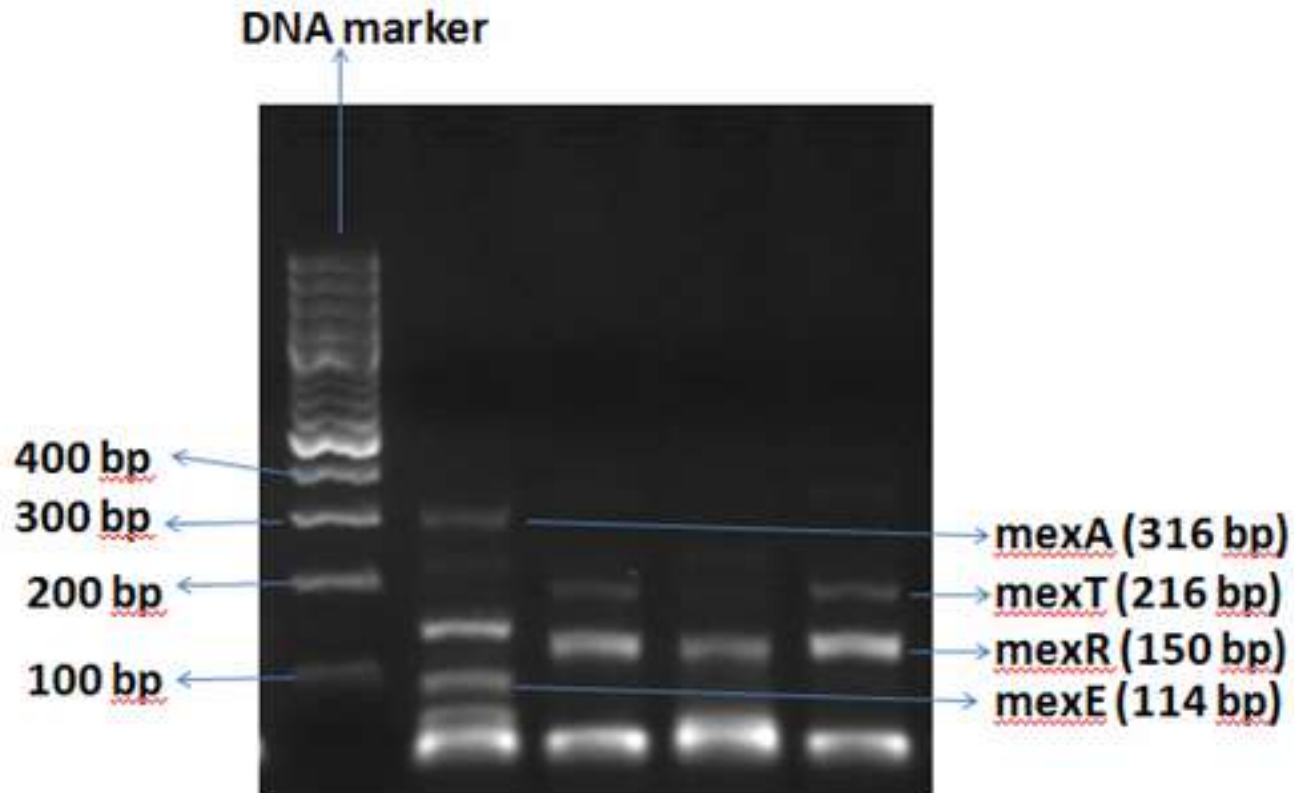
Diğer genler için
Toplam 30 PZR siklusu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

- ❖ Oluşan ürünler %2 agaroz jelde yürütülerek etidyum bromid ile boyandıktan sonra jel görüntüleme sisteminde (Wealtec, Dolphin-View, USA) görüntülendi.

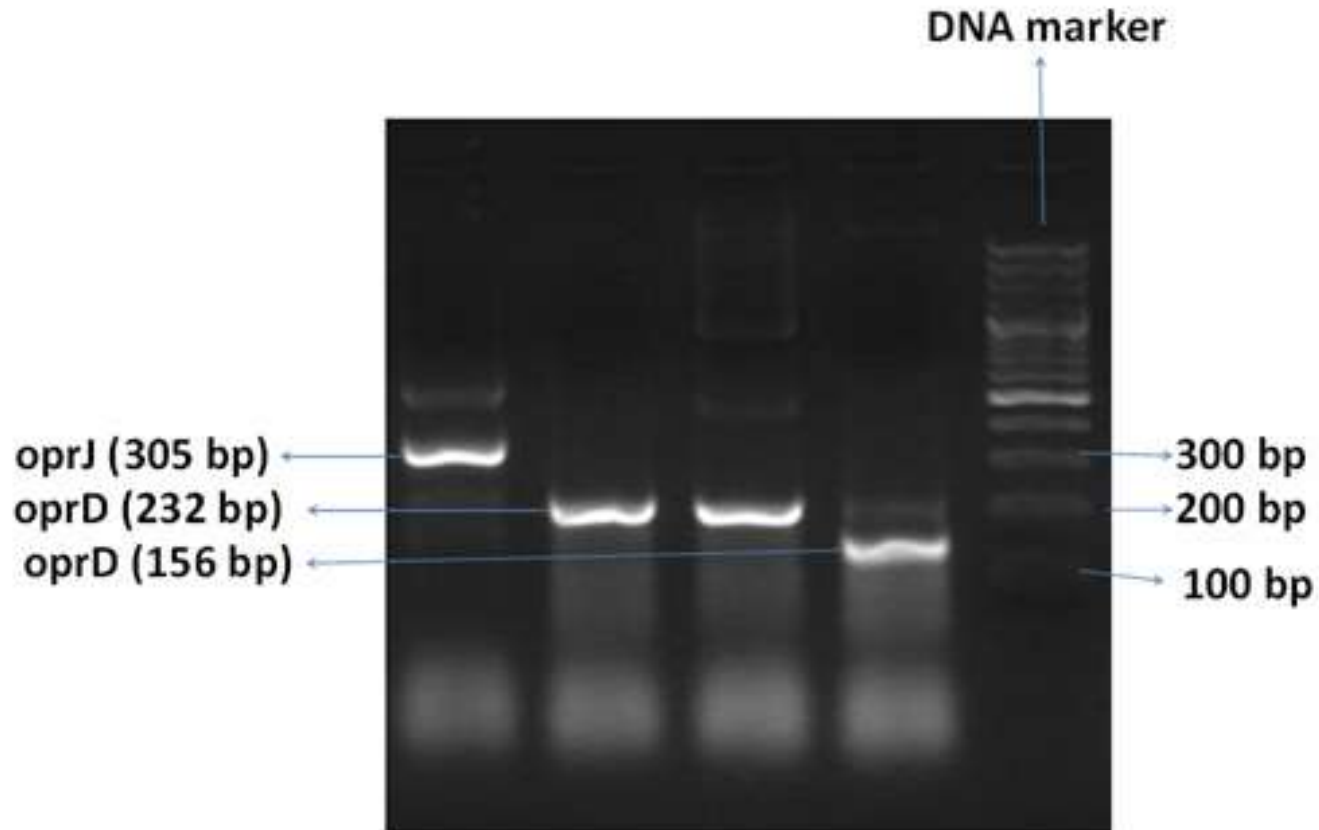


Multipleks PZR Grup 1



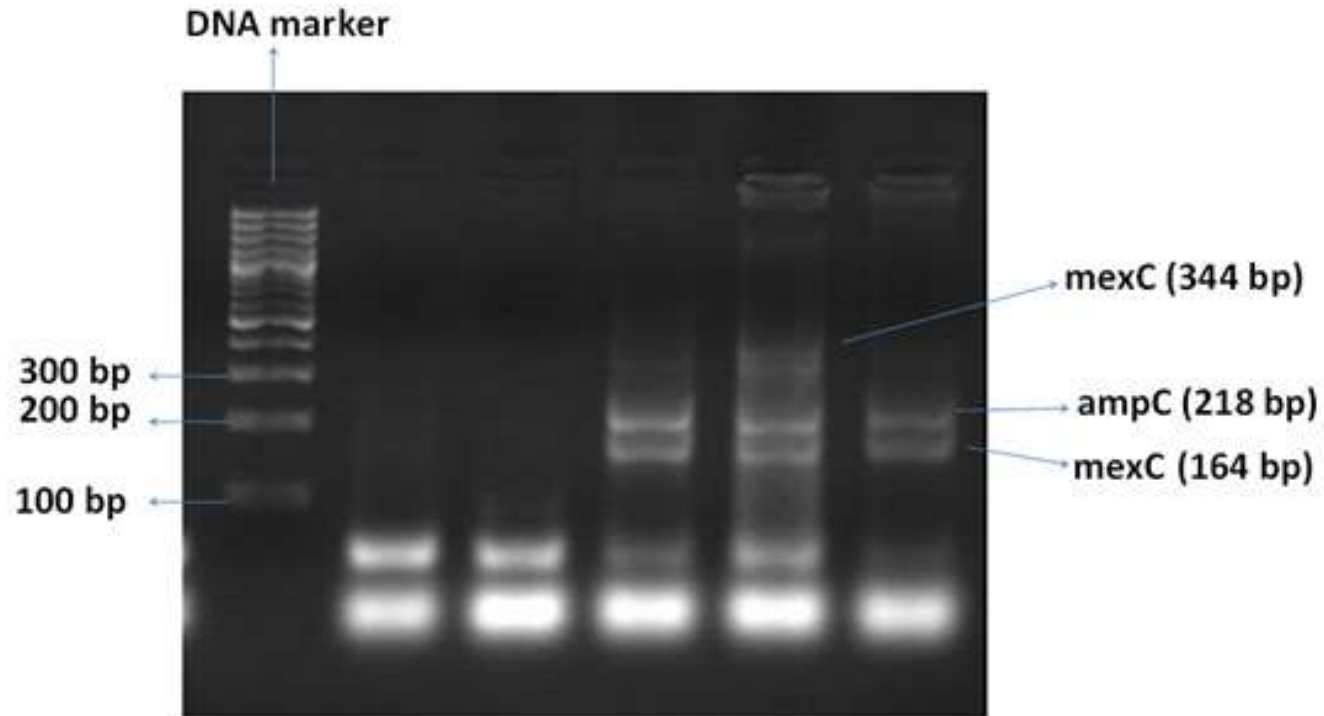
mexA, mexT, mexR ve mexE genlerinin
ekspresyonunu gösteren multipleks PZR ürünleri

Multipleks PZR Grup 2



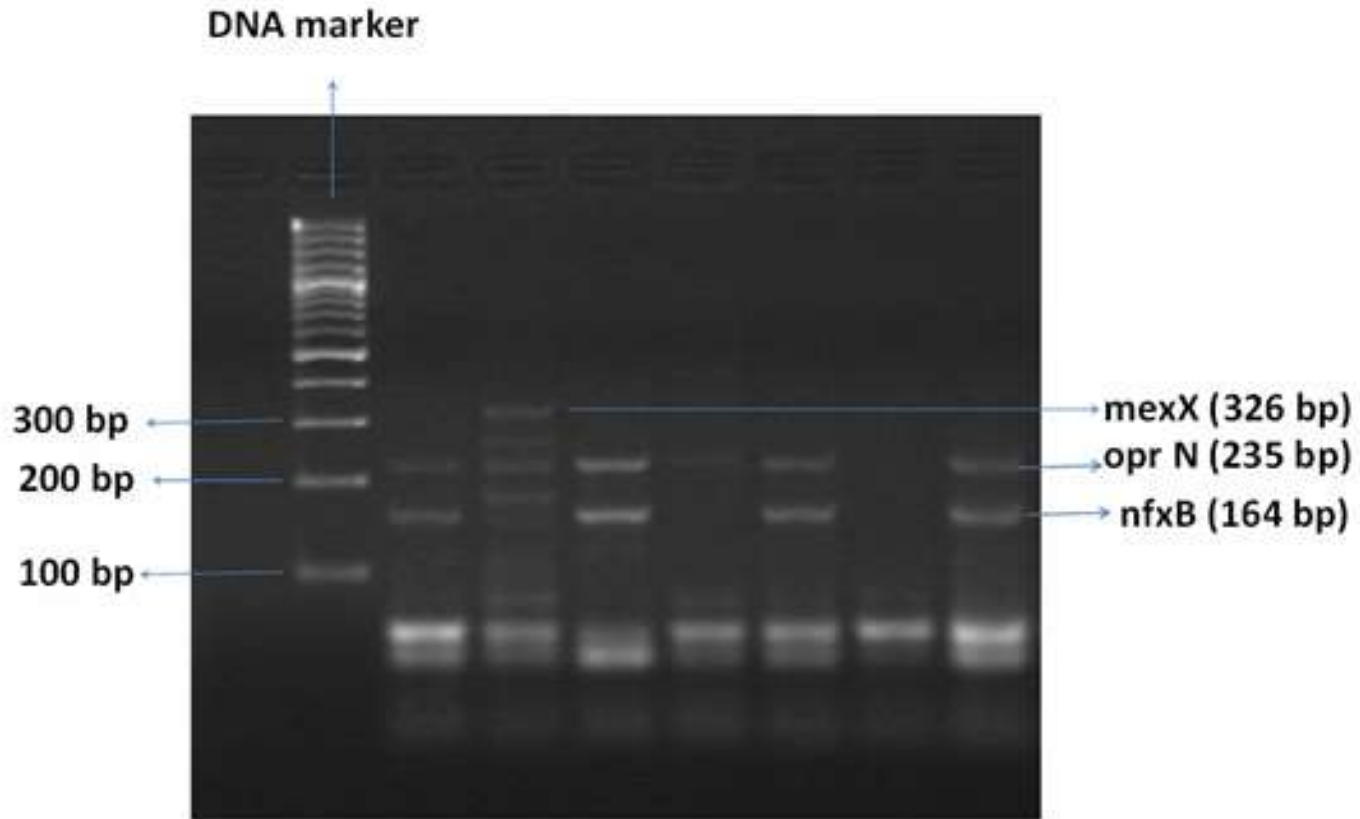
oprJ ve oprD genlerinin ekspresyonunu
gösteren multipleks PZR ürünleri

Multipleks PZR Grup 3



mexC ve ampC genlerinin
ekspresyonunu gösteren multipleks PZR ürünleri

Multipleks PZR Grup 4

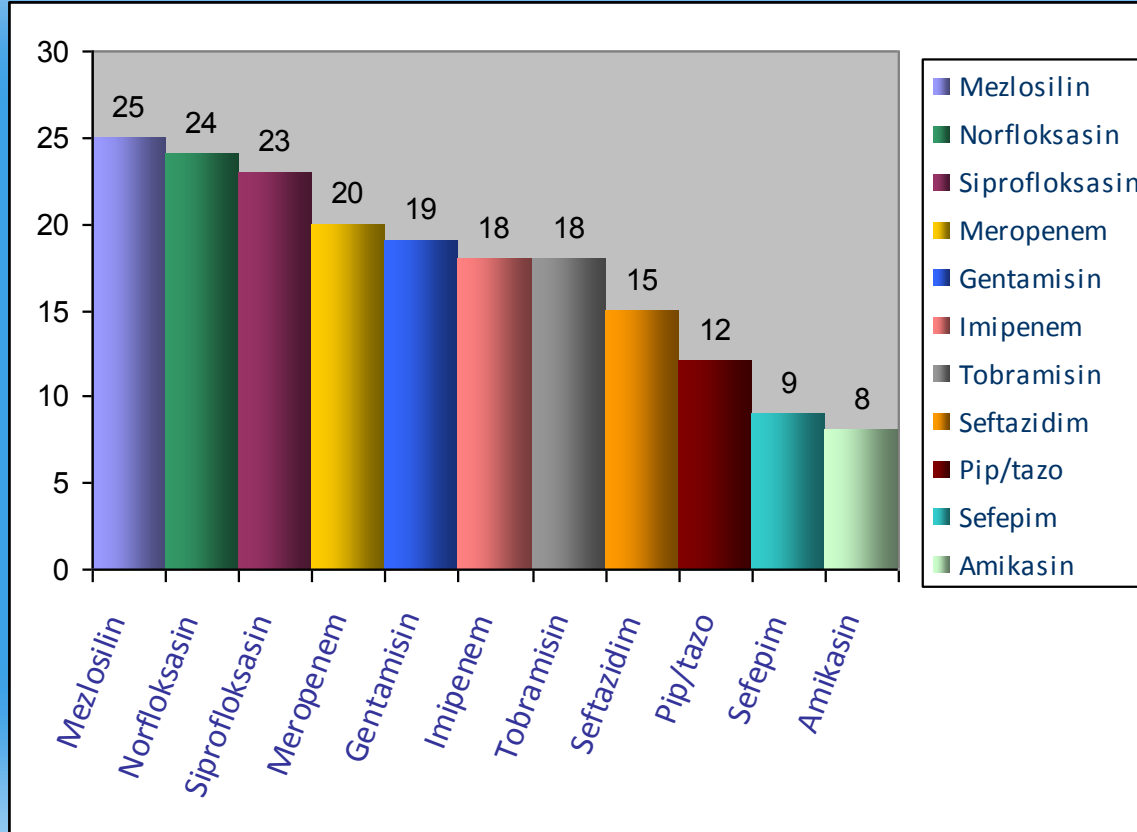


mexX, oprN, nfxB genlerinin
ekspresyonunu gösteren multipleks PZR ürünleri



BULGULAR

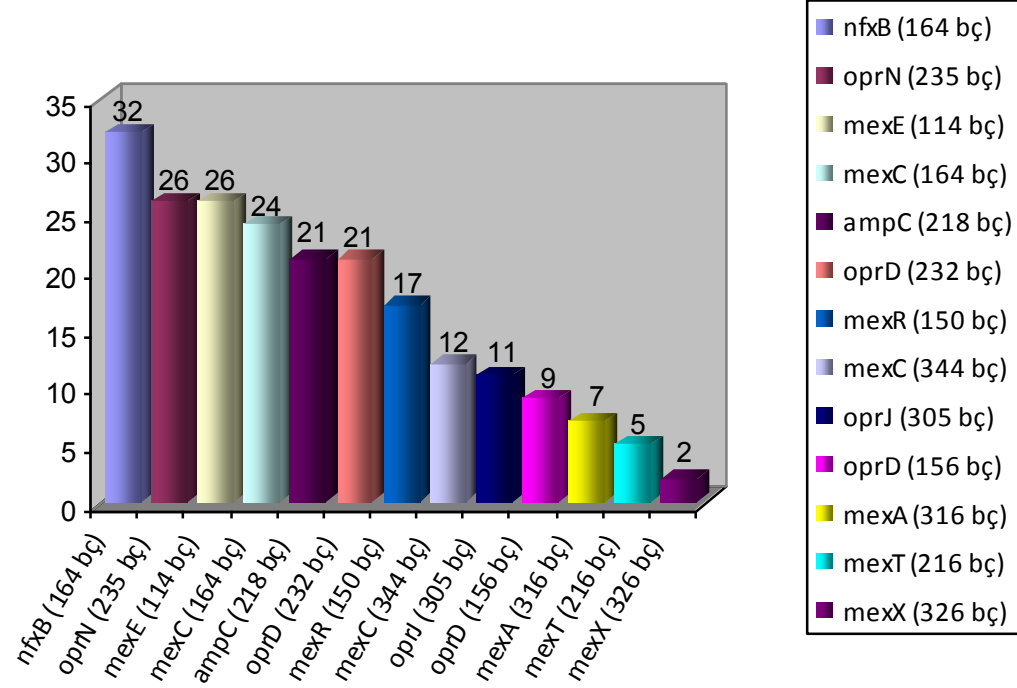
Antimikrobiyal Direnç



Direnç Genleri

- ❖ Yedi kökende (%14) direnç genlerinin hiçbirisi saptanmadı.
- ❖ 43 köken (% 86) bir veya birden fazla direnç geni içeriyordu.
- ❖ Sadece dört kökende (% 8) bir direnç geni bulundu.

GENLER



Köhen No.*	Materyal**	Antibiyotik Dayanıklıdan†											Antimikrobiyal Direnç Genleri										
		MEZ	TPZ	CAZ	FEP	AK	GN	TOB	IPM	MEM	CIP	NOR	mexA	mexC	mexE	mexR	mexT	mexX	ampC	oprD	oprJ	oprN	nfxB
1	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R					+		+	+		+	+
2	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
3	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R										+	+
4	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
5	Tr. asp.	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R				+							+
6	Tr. asp.	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S		+								+	+
7	Balgam	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S			+	+							
8	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
9	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+								
10	Balgam	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+										
11	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			+					+	+		
12	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+			+							
13	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
14	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
15	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
16	Tr. asp.	R	I	I	I	I	R	R	S	S	R	R					+			+	+	+	+
17	Tr. asp.	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R			+							+	+
18	Tr. asp.	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R		+	+			+				+	+
19	Tr. asp.	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R		+	+			+	+				+
20	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+				+	+	+		+	+
21	Tr. asp.	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R										+	+
22	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S											
23	Tr. asp.	R	I	R	I	S	S	S	R	R	S	S			+	+						+	
24	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				+						+	
25	Br. lav.	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			+					+		+	+
26	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			+							+	+
27	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+						+	+	+
28	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+			+				+	+	+
29	Tr. asp.	R	I	R	I	S	I	S	S	S	I	R		+				+	+				+
30	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+	+		+	+				
31	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+								
32	Balgam	R	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	+	+	+	+			+	+		+	+
33	Tr. asp.	R	I	S	S	R	R	R	S	S	R	R		+	+	+	+		+	+	+	+	+
34	Tr. asp.	R	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R		+	+	+			+			+	+
35	Br. lav.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			+	+				+			
36	Tr. asp.	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R		+	+	+		+	+	+			+
37	Tr. asp.	R	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R		+	+	+		+	+	+			+
38	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+	+		+	+		+	+	+
39	Tr. asp.	R	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R			+				+	+	+	+	+
40	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	+	+	+	+	+		+	+		+	+
41	Tr. asp.	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R				+	+			+	+	+	+
42	Balgam	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S		+	+	+			+	+		+	+
43	Tr. asp.	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	+	+	+				+	+		+	+
44	Tr. asp.	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R							+	+		+	+
45	Tr. asp.	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R								+	+		+
46	Tr. asp.	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R		+					+	+	+		+
47	Tr. asp.	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R		+					+	+			+
48	Tr. asp.	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	+	+	+	+	+		+	+		+	+
49	Tr. asp.	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R		+					+	+	+	+	+
50	Tr. asp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		+	+				+	+		+	+

Beta-Laktamlara Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>mexA</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Piperasilin/tazobaktam</u>	Duyarlı	23	4	p>0.05
	Dirençli	20	3	
<u>Seftazidim</u>	Duyarlı	27	3	p>0.05
	Dirençli	16	4	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	28	4	p>0.05
	Dirençli	15	3	
<u>Meropenem</u>	Duyarlı	26	4	p>0.05
	Dirençli	17	3	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>mexC</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	20	12	0.048
	Dirençli	6	12	
<u>Piperasilin/tazobaktam</u>	Duyarlı	18	9	0.025
	Dirençli	8	15	
<u>Meropenem</u>	Duyarlı	17	13	p>0.05
	Dirençli	9	11	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>mexX</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	31	1	p>0.05
	Dirençli	17	1	
<u>Seftazidim</u>	Duyarlı	29	1	p>0.05
	Dirençli	19	1	
<u>Piperasilin/tazobaktam</u>	Duyarlı	26	1	p>0.05
	Dirençli	22	1	
<u>Meropenem</u>	Duyarlı	28	2	p>0.05
	Dirençli	20	0	
<u>İmipenem</u>	Duyarlı	30	2	p>0.05
	Dirençli	18	0	

Beta-Laktamlara Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>mexR</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Seftazidim</u>	Duyarlı	21	9	p>0.05
	Dirençli	12	8	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	22	10	
	Dirençli	11	7	
<u>Meropenem</u>	Duyarlı	21	9	
	Dirençli	12	8	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>mexT</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Piperasilin/tazobaktam</u>	Duyarlı	23	4	p>0.05
	Dirençli	22	1	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	28	4	p>0.05
	Dirençli	17	1	
<u>Seftazidim</u>	Duyarlı	26	4	p>0.05
	Dirençli	19	1	
<u>İmipenem</u>	Duyarlı	28	4	p>0.05
	Dirençli	17	1	
<u>Meropenem</u>	Duyarlı	26	4	p>0.05
	Dirençli	19	1	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>ampC</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Mezlosilin</u>	Duyarlı	20	5	0.002
	Dirençli	9	16	
<u>Piperasilin/tazobaktam</u>	Duyarlı	21	6	0.002
	Dirençli	8	15	
<u>Seftazidim</u>	Duyarlı	21	9	0.035
	Dirençli	8	12	
<u>Sefepim</u>	Duyarlı	23	9	0.008
	Dirençli	6	12	

Beta-Laktamlara Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	oprD		p
		Negatif	Pozitif	
İmipenem	Duyarlı	17	17	p>0.05
	Dirençli	7	7	
Meropenem	Duyarlı	17	17	p>0.05
	Dirençli	7	7	

Antibiyotik	Disk difüz.	oprJ		p
		Negatif	Pozitif	
Sefepim	Duyarlı	27	5	p>0.05
	Dirençli	12	6	
İmipenem	Duyarlı	26	6	p>0.05
	Dirençli	13	5	
Meropenem	Duyarlı	25	5	p>0.05
	Dirençli	14	6	

Antibiyotik	Disk difüz.	oprN		p
		Negatif	Pozitif	
Sefepim	Duyarlı	18	14	p>0.05
	Dirençli	6	12	
İmipenem	Duyarlı	18	14	p>0.05
	Dirençli	6	12	
Meropenem	Duyarlı	17	13	p>0.05
	Dirençli	7	13	

Kinolonlara Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	mexA		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	22	4	p>0.05
	Dirençli	21	3	
Norfloksasin	Duyarlı	22	4	
	Dirençli	21	3	

Antibiyotik	Disk difüz.	mexE		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	13	13	p>0.05
	Dirençli	11	13	
Norfloksasin	Duyarlı	13	13	
	Dirençli	11	13	

Antibiyotik	Disk difüz.	mexC		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	16	10	p>0.05
	Dirençli	10	14	
Norfloksasin	Duyarlı	16	10	
	Dirençli	10	14	

Antibiyotik	Disk difüz.	mexR		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	17	9	p>0.05
	Dirençli	16	8	
Norfloksasin	Duyarlı	17	9	
	Dirençli	16	8	

Antibiyotik	Disk difüz.	mexX		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	25	1	p>0.05
	Dirençli	23	1	
Norfloksasin	Duyarlı	25	1	
	Dirençli	23	1	

Antibiyotik	Disk difüz.	mexT		p
		Negatif	Pozitif	
Siprofloksasin	Duyarlı	23	3	p>0.05
	Dirençli	22	2	
Norfloksasin	Duyarlı	23	3	
	Dirençli	22	2	

Kinolonlara Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>oprJ</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Siprofloksasin</u>	Duyarlı	24	2	0.016
	Dirençli	15	9	
<u>Norfloksasin</u>	Duyarlı	24	2	0.016
	Dirençli	15	9	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>nfxB</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Norfloksasin</u>	Duyarlı	18	8	0.000
	Dirençli	0	24	
<u>Siprofloksasin</u>	Duyarlı	18	8	0.000
	Dirençli	0	24	

Antibiyotik	Disk difüz.	<u>oprN</u>		p
		Negatif	Pozitif	
<u>Siprofloksasin</u>	Duyarlı	16	10	0.046
	Dirençli	8	16	
<u>Norfloksasin</u>	Duyarlı	16	10	0.046
	Dirençli	8	16	

Aminoglikozidlere Etkili Direnç Genleri

Antibiyotik	Disk difüz.	mexX		P
		Negatif	Pozitif	
Amikasin	Duyarlı	35	1	p>0.05
	Dirençli	13	1	
Gentamisin	Duyarlı	28	1	p>0.05
	Dirençli	20	1	
Tobramisin	Duyarlı	30	1	p>0.05
	Dirençli	18	1	

Sonuçlar

- ❖ Kökenlerin % 86'sının bir veya birden fazla direnç geni içerdiği bulundu.
- ❖ FEP ve PTZ direnci ile mexC geni,
- ❖ MEZ, PTZ, CAZ ve FEP direnci ile AmpC geni,
- ❖ CIP ve NOR direnci ile oprJ, oprN ve nfxB genleri arasında anlamlı ilişki bulundu.

Sonuçlar

- ❖ Çok fazla sayıda direnç geni içermesine rağmen antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olan kökenlerde bulunmaktaydı.
- ❖ Bu kökenlerin tedavi sırasında direnç geliştirme olasılığı çok yüksektir.
- ❖ Bu sebeple fenotipik yöntemlerle antimikrobiyallere karşı duyarlılık araştırmak yerine genotipik olarak antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması daha anlamlıdır.

Şükranla anıyoruz...



1881-1938



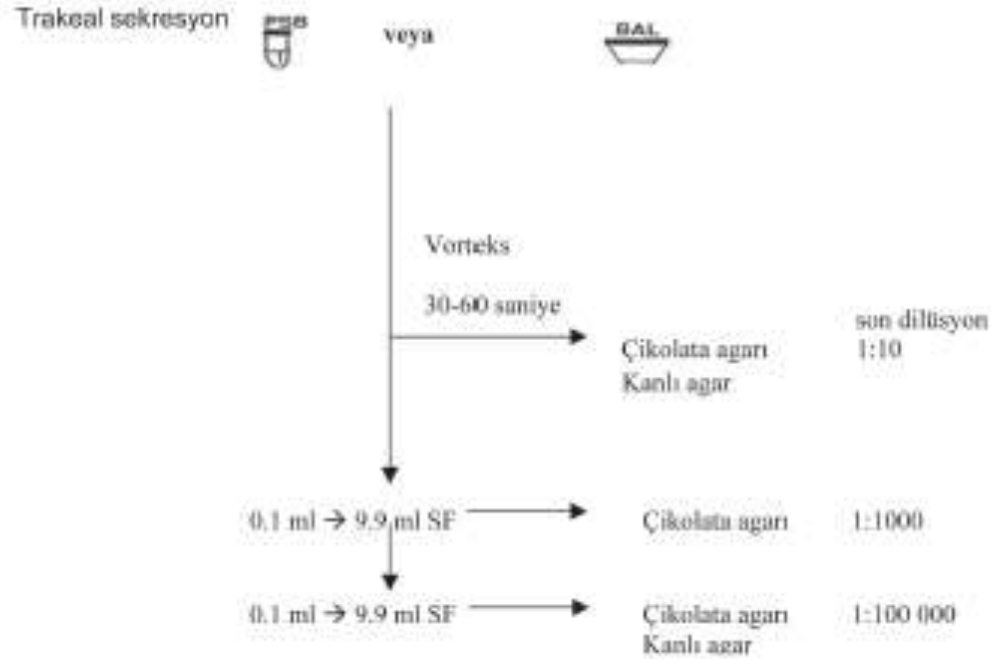
Doğal direnç

❖ *Pseudomonas*'lar yaygın olarak kullanılan penisilinlere, birinci, ikinci kuşak sefalosporinlere, tetrasiklinlere, kloramfenikol ve vankomisine dirençlidir

KANTİTATİF KÜLTÜR TEKNİĞİ

(Laboratuvara gönderildiğinde trakeal aspirasyon örnekleri genellikle dize edilmektedir. Buna karşın PSB örnekleri

1/1000 ; BAL örnekleri ise 1/100 oranında sulandırılmış olarak kabul edilmektedir. Kantitatif kültür eşik değerleri bu dilüsyon oranlarına göre belirlenmiştir.)



CDC'nin nozokomiyal alt solunum yolu inf. tanı kriterleri

❖ Kriter 1

- Hastanın FM'de ralinin olması
- En az biri
 - Pürülan balgam (yeni başlayan) veya balgamın karakterinde değişme
 - Kan kültüründe mo üremesi
 - Transtrakeal aspirat broşial fırçalama veya biopsi ile elde edilen materyalde etiyolojik ajanın izolasyonu

CDC'nin nozokomiyal alt solunum yolu inf. tanı kriterleri

❖ Kriter 2

- AC grafisinde yeni ve ilerleyici infiltrat, konsolidasyon, kavitasyon veya plevral efüzyon görülmesi
- En az biri
 - Pürülan balgam (yeni başlayan) veya balgamın karakterinde değişme
 - Kan kültüründe mo üremesi
 - Transtrakeal aspirat broşial fırçalama veya biopsi ile elde edilen materyalde etiyolojik ajanın izolasyonu
 - Sol. Sekresyonlarında viral Ag'nin saptanması veya virusun izolasyonu
 - Patojen için tek Ab titresi (IgM) veya 4 kat artmış Ab
 - Pnömoninin histopatolojik kanıtının olması

DNA Ekstraksiyonu

- ❖ DNA izolasyonu Kado ve Liu'nun yöntemi modifiye edilerek yapıldı.
- ❖ Bakteri kültürü L-B buyyonda 37 °C'de 18 saat inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sonunda bakteriler 4000 devirde 15 dk santrifüj edildi.
- ❖ Pellet üzerine 100 µl buffer (20 mM tris-asetat ve 2 mM EDTA, pH 7.9) eklendi.
- ❖ Sonra 400 µl lysing buffer ilave edildi. (%3 SDS and 50 mM tris, pH 12.6, pH 2N NaOH ile ayarlandı).

DNA Ekstraksiyonu

- ❖ 65 C'de 90 dk lizis işlemi için tutuldu.
- ❖ Sıvı fazdaki DNA üzerine eşit miktarda izopropanol koyularak nükleik asit presipitasyonu yapıldı.
- ❖ Sonra pellet üzerine 50 µl TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8) buffer konarak DNA çözüldü.

Antimikrobiyal Direnç Oranları (Disk difüzyon metodu ile)

Antimikrobiyaller	Sayı (%)
Mezlosilin	25 (50)
Norfloksasin	24 (48)
Siprofloksasin	23 (46)
Meropenem	20 (40)
Gentamisin	19 (38)
Imipenem	18 (36)
Tobramisin	18 (36)
Seftazidim	15 (30)
Piperasilin/tazobaktam	12 (24)
Sefepim	9 (18)
Amikasin	8 (16)

Antimikrobiyal Direnç Genleri

Genler	Sayı (%)
nfxB (164 bç)	32 (64)
oprN (235 bç)	26 (52)
mexE (114 bç)	26 (52)
mexC (164 bç)	24 (48)
ampC (218 bç)	21 (42)
oprD (232 bç)	21 (42)
mexR (150 bç)	17 (34)
mexC (344 bç)	12 (24)
oprJ (305 bç)	11 (22)
oprD (156 bç)	9 (18)
mexA (316 bç)	7 (14)
mexT (216 bç)	5 (10)
mexX (326 bç)	2 (4)

Pompa	MFP	OMP	Genler	Reg
<u>mex B</u>	<u>mexA</u>	<u>oprM</u>	<u>mexA, mexD,</u> <u>oprM</u>	<u>mexR</u>
<u>mex D</u>	<u>mexC</u>	<u>oprJ</u>	<u>mexC, mexD,</u> <u>oprJ</u>	<u>mexS</u>
<u>mex F</u>	<u>mexE</u>	<u>oprN</u>	<u>mexE, mexF, oprN</u>	<u>mexT</u>
<u>Mex Y</u>	<u>mexX</u>	<u>oprM</u>	<u>mexX, mexY</u>	<u>mexZ</u>