

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Bülent BAYSAL**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN SOYUTLANAN *ACINETOBACTER BAUMANNII*
SUŞLARINDA PER-1 TİPİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE RAPD PCR YÖNTEMİ İLE KLONAL
YAKINLIĞININ İNCELENMESİ**

Arş. Gör. Dr. Mediha COŞAR

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. E. İnci TUNCER**

**KONYA
2009**

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	iii
TABLO ve GRAFİKLER DİZİNİ.....	iv
RESİM DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ACINETOBACTER CİNSİ	3
2.1.1. Taksonomi	3
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler.....	3
2.1.3. Epidemiyoloji.....	5
2.1.4. Patogenez ve Virulans.....	6
2.1.5. <i>Acinetobacter</i> İnfeksiyonları	7
2.1.6. <i>Acinetobacter</i> İnfeksiyonlarında Tedavi.....	10
2.1.7. <i>Acinetobacter</i> Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu.....	12
2.1.8. PCR.....	20
2.1.9. Hastane İnfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi.....	21
2.1.10. RAPD PCR.....	22
2.1.11. Jel Elektroforezi.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. BAKTERİ İZOLASYONU	25
3.2. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> İZOLATLARININ TANIMLANMASI.....	25
3.3. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> İZOLATLARININ SEFTAZİDİM'E DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI	26
3.4. DNA İZOLASYONU.....	26
3.5. PER-1 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	27
3.6. AGAR OZ JELİN HAZIRLANMASI VE ELEKTROFOREZ.....	28

3.7. RAPD PCR YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	29
3.8. DENDOGRAM.....	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	37
6. ÖZET	46
6.1. AMAÇ	46
6.2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	46
6.3. BULGULAR	47
6.4. SONUÇ	47
7. ABSTRACT	48
7.1. OBJECTIVE.....	48
7.2. MATERIALS and METHODS.....	48
7.3. RESULTS	48
7.4. CONCLUSION	49
9. TEŞEKKÜR.....	50
8. KAYNAKLAR.....	51

KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AME	: Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
AP-PCR	: Arbitrary Primed PCR
CAT1	: Kloramfenikol Asetiltransferaz 1
EMB	: Eozin Metilen Mavisı
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
IRT	: İnhibitör Dirençli TEM
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance
OMP	: Dış Membran Proteinleri
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TAE	: Tris-Asetat EDTA
TBE	: Tris-Borat EDTA
TSI	: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni

TABLO ve GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1: <i>Acinetobacter</i> türlerinin biyokimyasal reaksiyonları ve üreme özellikleri (1)	4
Tablo 2. Hastane infeksiyonu etkenlerinin tiplendirme yöntemleri	21
Tablo 3: Hastaların kliniklere göre dağılımı.....	31
Tablo 4: PER-1 taşıyan suşların izole edildiği hastaların yattığı servisler.....	36
Tablo 5: Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmaların verileri	44
Grafik 1: <i>A.baumannii</i> suşlarının E-test yöntemi ile seftazidime duyarlılıkları.....	32
Grafik 2: PER-1 pozitif suşların kliniklere göre dağılımı.	33

RESİM DİZİNİ

Resim 1: EMB besiyerinde <i>A.baumannii</i> kolonilerinin görünümü (Çalışmamızdan).....	31
Resim 2: E test yöntemi ile seftazidim dirençli bir <i>A.baumannii</i> suşu (Çalışmamızdan).	32
Resim 3: E test yöntemi ile seftazidim duyarlı bir <i>A.baumannii</i> suşu (Çalışmamızdan).....	32
Resim 4: PER-1 bantlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (Çalışmamızdan).....	33
Resim 5: Jel elektroforezde oluşan bantların Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (Çalışmamızdan).....	34
Resim 6: PER-1 taşıyan izolatların dendogramı (Çalışmamızdan).	35

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Acinetobacter türü bakterilerin klinik önemlerinin son 30 yıl içerisinde belirgin olarak arttığı gözlenmekte ve 1980'li yıllardan bu yana nozokomiyal infeksiyonlarda çoğul dirençli etken olarak izole edilmektedir. Bütün dünyada izolasyon sıklığı giderek artmakta olan hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* türlerinin tedavi ve kontrolünde ciddi zorluklar yaşanmaktadır. Hastanelerde invaziv girişim oranlarının belirgin olarak artması, bu etkenin etkileyebileceği hasta grubunun artması, bu bakterilerin çevre şartlarına uyumu, antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç/çoklu direnç bu bakterilerin önemini artırmaktadır. Yaş, kronik akciğer hastalığı, immunsupresyon, cerrahi, mekanik ventilasyon, gastrik tüpler, antibiyotik kullanımı, hastanede uzun süreli yatış bu bakteriler ile infeksiyona yakalanmada başlıca risk faktörleridir.

Acinetobacter cinsi bakteriler hareketsiz, aerobik, laktozu fermente etmeyen, Gram negatif kokobasillerdir. Bu bakteriye ait şimdiye kadar 21 genomik tür belirlenmiştir. Bu türler arasında en önemlisi ve en sık infeksiyon etkeni *Acinetobacter baumannii*'dir. Klinik olarak pnömoni [özellikle ventilatör ilişkili pnömoni (VİP)], bakteremi/sepsis, üriner sistem infeksiyonu, yumuşak doku infeksiyonları, menenjit ile karşımıza çıkmaktadırlar. *Acinetobacter*'ler doğal ortamda ve hastane ortamında her yerde bulunmaktadırlar. *Acinetobacter* türlerinin dış ortamlarda (özellikle kuruluğa dirençli olmasından dolayı) uzun süre yaşayabilmesi çok büyük sorun yaratmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerindeki endemik infeksiyonların önemli bir kısmından ve genellikle çoklu dirençli suşlarla gelişen epidemilerden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Başlangıçta *Staphylococcus aureus*'da saptanan beta-laktamazlar, daha sonra başta *E.coli* olmak üzere diğer Gram-negatif bakterilerde de gösterilmiştir. Ülkemizde nonfermentatif Gram negatif çomaklarda yaygın olan, TEM ve SHV grubuna bağlı olmayan, class A'da yer alan Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) türevlerinden biri PER-1'dir. Bu enzim ilk olarak 1995 yılında seftazidime dirençli bir *Pseudomonas aeruginosa* izolatında tanımlanmış ve daha sonra *Salmonella typhimurium*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* gibi farklı türlerde saptanmıştır. 2000 yılına kadar sadece ülkemizde gösterilen bu enzim, bundan sonra başka ülkelerden de bildirilmiştir. Özellikle PER-1 tipi GSBL enzimi bulunduran *A.baumannii* infeksiyonlarının prognozu daha kötü olmaktadır.

Bu bakterilere bağlı infeksiyonlarda tedaviden 6nce infeksiyon kontrol programı 6ok daha 6nem taşıtmaktadır. D6zenli s6rveyans yapılıp elde edilen veriler ışığında kontrol politikaları geliştirilmelidir. Yatan hasta ve personelden klinik 6rnekler yanında 6evre k6lt6rleri de yapılıp, 6reyen bakteriler molek6ler y6ntemlerle tiplendirilip salgına neden olan klonlar araştırılmalıdır. *Acinetobacter*'leri selektif olarak se6en veya 6oklu ilaca diren6li *A.baumannii* infeksiyonları oluşumuna zemin hazırlayan antibiyotik kullanımını sonlandırıp, d6zenli s6rveyans verilerini esas alan kısıtlı antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmelidir.

Bu 6alışmada; Sel6uk 6niversitesi Meram Tıp Fak6ltesi Hastanesinde hastaların kan k6lt6rlerinden izole edilen *A.baumannii* izolatlarından seftazidime diren6li suşlarda Polimerase Chain Reaction (PCR) y6ntemi ile PER-1 tipi GSBL enzimatik genlerinin varlığının araştırılması ve PER-1 geni taşıyan *A.baumannii* izolatları arasında random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR molek6ler y6ntemi ile hastane ortamındaki genotipik ilişki 6ıkartılarak hastane i6erisindeki t6r yakınlığının saptanması ama6lanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ACINETOBACTER CİNSİ

2.1.1. Taksonomi

Acinetobacter cinsi bakteriler, *Moraxellaceae* ailesinde yer almaktadırlar (1, 2). DNA'daki G+C oranı %38-47 mol.dur ve bu özelliği ve görünümü ile *Moraxella*'lara benzemektedirler (3). Hareketsiz, oksidaz negatif, gram negatif kok/kokobasillerdir. İlk kez Beijerinck tarafından 1911 yılında topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiş ve Brisou ve Prevot 1954 yılında *Acinetobacter* ismini önermişlerdir (4). 1986 yılında Bouvet ve Grimont DNA-DNA hibridizasyon ve beslenme karakterlerine göre 12 farklı grupta sınıflandırmışlardır. 1989 yılında da Tjenberg ve Ursing 3 yeni DNA grubu tanımlamışlar ve 13'den 15'e kadar kodlamışlar ve aynı zamanlarda Bouvet ve Jeanjean 13'den 17'ye kadar 5 DNA grubu tanımlamışlardır. Tjenberg ve Ursing tarafından tanımlanan 2 DNA grubu, Bouvet ve Jeanjean'ın tanımladığı DNA gruplarından fenotipik olarak farklıdır (1). Bugüne kadar DNA/DNA hibridizasyonuna dayalı çalışmalara göre 32 genomik tür tanımlanmıştır (2). Genomik tür 1 *A.calcoaceticus*'dur ve *Acinetobacter*lerin temsilcisidir. Özellikle topraktan izole edilmektedirler. Genomik tür 2 *A.baumannii*, genomik tür 4 *A.haemolyticus*, genomik tür 5 *A.junii*, genomik tür 7 *A.johnsonii*, genomik tür 8 *A.lwoffii*, genomik tür 12 *A.radioresistens* olarak adlandırılmıştır. Kalan genomik türlerin çoğu adlandırılmamıştır (1). Bunlardan *A. calcoaceticus*, *A.baumannii*, genomik tür 3 ve genomik tür 13 fenotipik olarak birbirlerinden ayırtedilemedikleri için *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* kompleksi olarak da adlandırılmaktadırlar (1, 2). Tüm bu türler arasında en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir (1, 5, 6).

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter cinsi; non-fermantatif, zorunlu aerop, hareketsiz, pigmentsiz (bazıları sarı pigment yapabilirler), oksidaz negatif, nitratları redükte etmeyen, katalaz pozitif ve bazen ince kapsüllü bakterilerdir. Fimbriaları vardır ve flajellaları olmadığı için hareketsizdirler. Üremenin logaritmik fazında 1-1.5 x 1.5-2.5 µm boyutlarında basil, duraklama fazında ise kokobasiller şeklinde görülürler. Gram boyası ile, Gram negatif

kokobasil, diplokok, gram labil-kokobasiller şeklinde boyanabilirlerse de, bazen alkol ile dekolorizasyona dirençli olabilmektedirler (2, 4, 6, 7, 8).

Genomik tür 2, 3 ve 13TU 37⁰C ve daha yüksek ısıda üreyebilirken, diğer genomik türler daha düşük ısıda üreyebilmektedirler. Üreme ısısı genel olarak 30⁰C olarak tavsiye edilmektedir (7). Her türlü besiyerinde üreyebilirler. 24 saatlik inkübasyondan sonra %5 koyun kanlı agarda düzgün, opak, krem renğinde, 0.5-2 mm çapında, bazen mukoid, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden daha küçük koloniler oluştururlar. Suşların çoğu MacConkey agarda iyi ürer ve laktöz negatif koloniler yaparlar (1, 7, 9, 10). Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve Kligler Iron Agar besiyerinde dip kısımda üremezler (9). Birkaç suş kanlı agarda hemoliz yapabilmektedir (4).

Acinetobacter'ler glukozu okside edenler (özellikle *A.baumannii*) ve glikozu okside etmeyenler (özellikle *A.lwoffii*) diye 2 gruba ayrılabilirler (11). Sakkarolitik suşlar MacConkey agarda pembe koloniler yapmaktadırlar (4). *Acinetobacter* türlerini klinik örneklerden direkt olarak izole edebilmek için ayırteci ve selektif besiyerleri de geliştirilmiştir (1). Bu amaçla kullanılacak besiyerleri Herellea agar (Difco) ve Leeds *Acinetobacter* Medium'dur (7).

Acinetobacter türlerinin ilk identifikasyonu sitokrom oksidaz aktivitesinin olmamasına, hareketsiz oluşuna, penisiline dirençli oluşuna göre yapılabilir (1, 12).

Tablo 1: *Acinetobacter* türlerinin biyokimyasal reaksiyonları ve üreme özellikleri (1).

Organizma	Genomik tür	37 ⁰ C'de üreme	44 ⁰ C'de üreme	Hemoliz	Jelatin hidrolizi	*OF Dekstroz	Arginin	Malonat
<i>A.johnsonii</i>	7	-	-	-	-	-	**D	D
<i>A.baumannii</i>	2	+	+	-	-	+	+	+
<i>A.haemolyticus</i>	4	+	-	+	+	D	+	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	6	+	-	+	+	D	+	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	10	+	-	-	-	+	-	-
<i>A.calcoaceticus</i>	1	+	-	-	-	+	+	+
<i>Acinetobacter spp.</i>	3	+	-	-	-	+	+	D
<i>Acinetobacter spp.</i>	12	+	-	-	-	D	+	+
<i>A.junii</i>	5	+	-	-	-	-	+	-
<i>A.lwoffii</i>	8/9	+	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	11	+	-	-	-	-	-	-

* Oksidasyon-Fermantasyon Testi

** Değişken

2.1.3. Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri her yerde bulunabilen saprofit bakterilerdir (11). Doğada toprak, su, atık sularında ve hastane ortamı florasında bulunmaktadır (6, 9). Solunum sistemi ekipmanları gibi nemli yüzeylerde ve insan derisi gibi kuru yüzeylerde yaşayabilmektedirler (11). *Acinetobacter* türlerinin sağlıklı insanların derisinde, ağız florasında, solunum yollarında, genitouriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunduğu gösterilmiştir (1, 7). Bir çalışmada sağlıklı gönüllülerinin %40'ının derilerinde çeşitli *Acinetobacter* türleri taşıdığı bulunmuştur (1).

Acinetobacter taşıyıcılık oranı hastanede yatan hastalarda, topluma göre daha yüksektir ve kolonizasyonun boyutu hospitalizasyon boyunca artmaktadır (13). Hospitalize hastalarda trakeostomi ve boğaz kültürü örneklerinde *Acinetobacter* türleri pozitif bulunmuştur. Özellikle mekanik ventilasyon gerektiren hastalardaki salgınlar solunum sistemindeki yüksek kolonizasyon oranı ile ilişkilendirilmiş ve aynı zamanda salgın boyunca hastaların derilerinde kolonizasyon saptanmıştır. Bazı çalışmalarda solunum sistemi ve gastrointestinal sistemde kolonizasyon, dirençli suşların major rezervuarı olarak bulunmuştur (7). Thamlikitkul ve ark. (14), Tayland'da yaptıkları bir çalışmada ayakta ve yatan hastaların deri florasını incelemişler, yatan hastaların derilerinde kolonize olan *Acinetobacter* türlerinin prevalansını ayakta hastaların derilerinden daha fazla bulmuşlar ve bu bakterilerin de %62'sini *A.baumannii* olarak tanımlamışlardır.

Son zamanlardaki çalışmalarda *A.baumannii* yiyeceklerden ve artropodlardan da izole edilmiştir. Bir çalışmada sokakta yaşayan insanlarda vücut bitlerinde de *A.baumannii* varlığı saptanmış, bunların infeksiyonlar için kaynak olabileceği belirtilmiştir (1, 15). Bir başka çalışmada da çeşitli yiyeceklerde %17 oranında *Acinetobacter* türleri üretilmiş ve hastanede yatan hastalarda gastrointestinal kolonizasyon için gıdaların kaynak olabileceği vurgulanmıştır (1).

Afganistan ve Irak-Kuveyt bölgesinde yaralanan ve hastaneye yatan 102 hastanın kan kültürlerinde *A.baumannii* üremiştir. Vietnam savaşı sırasında ekstremitelerde yaralanmalarında en sık izole edilen Gram-negatif bakteri *A.baumannii* olmuştur. Afganistan'dan dönen Kanadalı askerlerde çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter*'e bağlı ventilatör ilişkili pnömoni tanımlanmıştır. Tüm bu olgularda kaynak bilinmese de, *Acinetobacter* türleri nemli ve kuru ortamda yaşayabildiği için çevresel kontaminasyon düşünülmüştür (1).

Hastanelerde cansız nesnelere *Acinetobacter* ile 5 ay kadar uzun bir süre kolonize olabilmektedir. En sık kaynaklar; ventilatörler, yataklar, yastıklar, karyolalar, distile su kapları, idrar kapları, intravenöz nütrisyon ekipmanları, içme suları, elektrokardiyografi topuzları, infüzyon pompaları, lavabolar, yıkama havuzları, duşlar, çelik servis masaları, taşınabilir radyoloji ekipmanları, çarşafklar, sabunluklar, termometreler, buhar makineleri, nebulizörlerdir. *Acinetobacter* türlerinin hastanelerde yataklar gibi cansız yüzeylerde yaşayabildiğine dair birçok çalışma vardır ve sağlık çalışanlarının ellerine bulaşmaktadır (1, 7). Bu bakterilerin neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlar, en çok hastane personelinin elleri ile tüm çevrenin kontamine edilmesine bağlı gelişmektedir. Hastane odalarındaki tozlar, etken için potansiyel bir rezervuar oluşturabilmektedir (16).

2.1.4. Patogenez ve Virulans

Acinetobacter cinsi bakteriler sağlıklı kişilerde genelde patojen değildirler (17). Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı infeksiyonlara neden olmaktadır (6). Malignite, yanık, konağın savunma sistemini baskılayan durumlar ve konağın yaşı infeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Ağır cerrahi girişim, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, endotrakeal tüp ve trakeostomi varlığı infeksiyon açısından başlıca risk faktörleridir (6, 7).

Acinetobacter cinsi bakterilerin virulans faktörleri sınırlıdır. Sitotoksin yapmazlar ve lipopolisakkarit duvarının endotoksijenik potansiyeli belli değildir (17).

Ancak virulanstan sorumlu bir takım faktörler de saptanmıştır:

1- Polisakkarit kapsül: L-ramnoz, D-glikoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşur. Her ne kadar kateter ve trakeal kanüllerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarında hidrofobik özellik yüksek olabilsede bakteri yüzeyini daha hidrofilik kıldığı düşünülmektedir.

2- Fimbria ve/veya kapsüller polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

3- Enzim yapımı: Dokulardaki lipidleri yıkarlar.

4- Lipopolisakkarit ve Lipid A: Hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırabilir.

5- Slime faktör: Bir çalışmada slime faktör yapımının nötrofillere karşı sitotoksosite ile ilişkili olduğu ve nötrofillerin migrasyonunu önlediği bulunmuştur. Ancak virülans derecesi ile slime faktör miktarı arasında korelasyon saptanmamıştır.

6- Aerobaktin gibi siderofor ve demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir (7).

7- Bakteriyosin: Bakteriyosin yapımı, kapsül varlığı, kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmesi ile beraber yaşam süresini artırmaktadır (17).

2.1.5. *Acinetobacter* İnfeksiyonları

Acinetobacter türleri fırsatçı patojen olarak infeksiyon yaparlar (8, 18). Son 30 yıldan fazladır nozokomiyal infeksiyonları artmıştır ve birçok hastane infeksiyonu salgını bildirilmiştir (18). *Acinetobacter* türleri için risk faktörleri; hospitalizasyon, hastanın genel durumunun kötü olması, mekanik ventilasyon, kardiyovasküler veya solunum yetmezliği, önceden geçirilmiş infeksiyon veya antibiyotik tedavisi, santral venöz veya üriner kateter varlığı olarak sayılabilir (6, 7, 18). Mahgoub ve ark. (19), yaptıkları çalışmada, mekanik ventilasyon, trakeostomi ve Foley kateter uygulamasının hastane ortamında *A.baumannii* bulaşması ile kuvvetle ilişkili olduğunu ve önceden antibiyotik kullanımının tüm izolatlar için en sık risk faktörü olduğunu bulmuşlardır.

Klinik örneklerden en sık izole edilen *A.baumannii*'dir. Bunu *A.lwoffii*, *A.haemolyticus*, *A.johnsonii*, genomik tür 3, genomik tür 6 izlemektedir. *A.johnsonii*, *A.lwoffii*, *A.radioresistens* gibi türler deri florasında doğal olarak bulunurken, orofarinks ve vajende kommensal olarak bulunabilirler. *A.lwoffii* menenjitte diğer türlere oranla daha sık etken olarak saptanmaktadır. *A.ursingii* hastanede yatan hastalarda bakteremi nedeni olabilmektedir. *A.junii* nadiren pediatrik hastalarda oküler infeksiyon ve bakteremi etkeni olarak saptanmıştır. Human Immun Deficiency Virus pozitif hastalarda toplum kaynaklı *A.radioresistens* bakteremi olgusu da bildirilmiştir (1).

Çok sayıda klinik tabloya neden olabilirler. Başlıca infeksiyonları, pnömoni (özellikle VİP), bakteremi/sepsis, üriner sistem infeksiyonu, nozokomiyal menenjit, yumuşak doku infeksiyonlarıdır (1, 7, 8, 18). Bu bakterilerin klinik örneklerden izole edilmeleri, infeksiyonu olduğu gibi kolonizasyonu da yansıtır olabilir. Bu nedenle infeksiyonlarının gerçek sıklığını hesaplamak zordur (7, 18, 20).

Solunum sistemi infeksiyonları:

Acinetobacter türlerinin neden olduğu pek çok nozokomiyal pulmoner infeksiyon salgınları bildirilmekte ve VİP’de *Acinetobacter* türlerinin rolü artmaktadır. 1992 ve 1997 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri’nde *Acinetobacter* türleri VİP olgularının %6’sından sorumlu tutulmuştur. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) verilerine göre, yoğun bakım ünitelerinde bu türlerin neden olduğu nozokomiyal pnömoni olgularının oranı 1986 yılında %4 iken 2003 yılında %7 olmuştur (21, 22).

Çeşitli çalışmalarda *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* kompleksine bağlı nozokomiyal ve VİP için risk faktörleri araştırılmış ve önceden antimikrobiyal kullanımı, reintübasyon, hastanede uzun süre kalmak, uzun süre mekanik ventilasyon uygulanması risk faktörleri olarak belirlenmiştir (21). Bundan başka yoğun bakımda yatış, ileri yaş, kronik akciğer infeksiyonu, immunsupresyon, cerrahi müdahale, endotrakeal veya gastrik tüp uygulanması da risk faktörleri olarak sayılabilmektedir (7).

Acinetobacter’in etken olduğu nozokomiyal veya VİP’in kliniği, diğer nozokomiyal patojenlerin neden olduğu pnömoniler ile benzerdir.

Toplum kaynaklı *Acinetobacter* pnömoni olguları sık olmasa da Avustralya ve Asya’dan bildirilmiştir. Sigara içenlerde, diabetlilerde, kronik akciğer infeksiyonu olanlarda daha sık olmakla beraber, sağlıklı kişilerde de görülebilmektedir (21).

Çakır-Edis ve ark. (23), Ekim 2003-Eylül 2004 yılları arasında hastane kökenli pnömoni olgularını değerlendirerek, 10 yıl önce yaptıkları çalışma ile karşılaştırmışlar ve solunum yollarında en sık *Acinetobacter* türlerini saptarken, bu bakterilerin sıklığının %38.2’den %44.5’e yükseldiğini belirtmişlerdir. Sevinç ve ark. (24), hastane kökenli pnömoni olgularında etken olarak *Acinetobacter* spp. oranını %42 ve mortalite oranını %47.6 olarak bulmuşlardır. Erdoğan ve ark. (25) ise yoğun bakımda yatan hastalarda VİP etkenleri arasında *Acinetobacter* cinsi bakterilerin sıklığını %13.9 olarak saptamışlardır.

Bakteremi:

En sık neden *A.baumannii*’dir ve *A.baumannii*’ye bağlı bakteremilerde diğer türlere göre klinik tablo daha ağır seyretmektedir (5, 7, 26). *Acinetobacter* bakteremisi çoğunlukla polimikrobiyal olsa da, tek patojen ile de gelişebilmektedir (5, 7). Baktereminin en sık kaynağı intravasküler ve solunum yolu kateterleridir. Çevreden hastalara direkt olarak veya

sağlık çalışanlarının elleri ile bulaşması önemlidir. Aynı zamanda, kolonize veya infekte hastalar *A. baumannii*'nin rezervuarlarıdır ve organizma hastadan hastaya transfer olabilmektedir (5).

A. baumannii'ye bağlı bakteremiler en sık yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Bilinen risk faktörleri; uzun süre hastanede yatış, invaziv prosedürler (santral venöz kateter, mekanik ventilasyon, cerrahi), daha önce başka bir serviste yatış, enteral beslenme, üriner kateter, immunsupresyon, nötropeni, geniş spektrumlu antibiyotik ile tedavidir (5, 27).

NNIS verilerine göre, yoğun bakım ünitelerinde bu türlerin neden olduğu bakteremi infeksiyonlarının insidansı 1975 yılında %1.8 iken 2003 yılında %2.4 olmuştur (21, 22).

A.baumannii bakteremisinin prognozu hala belirsizdir. Bazı çalışmalar prognozun kötü olduğunu savunurken, bazı çalışmalar ise mortaliteyi bakteremiye bağlamaktadırlar (5).

Köksal ve Samastı (28), 1997-2000 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaları araştırmışlar ve *Acinetobacter* türlerini %19 oranında ve Gram negatif etkenler arasında ikinci sıklıkta saptamışlardır. Demirbakan ve ark. (29), 2003 yılı boyunca bakteremili olgularda, kültürlerde üreyen bakterileri tanımlamışlar ve *Acinetobacter* türlerini %5.5 sıklıkta bulmuşlardır. Raveh ve ark. (30), 1990-2000 yılları arasında bir hastanede görülen bakteremi epizodlarını incelediklerinde, etken olarak *Acinetobacter* türlerini ilk 10 etken içinde saptamışlardır.

Merkezi sinir sistemi infeksiyonları:

Sporadik olgular bildirilse de, sekonder menenjit olguları daha fazla görülmektedir. Özellikle nörocerrahi prosedürlerini ve kafa travmalarını takiben gelişmektedir. Bunlar dışında lomber ponksiyon, ventrikülografi, myelografiyi takiben gelişen menenjit olguları da bildirilmiştir. Ventrikülostomi, serebrospinal sıvı kaçağı, uygunsuz antibiyotik kullanımı, beş günden uzun süreli ventrikül kateteri bulunması diğer risk faktörleridir. Mortalite oranı %20-27 arasında bildirilmektedir (7).

Güçlü ve ark. (31), Ocak 2000 ile Aralık 2003 arasında, beyin omurilik sıvısında üreyen bakteriler arasında *Acinetobacter* türlerini %6.8 oranında bulmuşlardır. Bu oran 2002 yılında %1.3 iken, 2003 yılında %5.4'e yükselmiştir (31). Saba ve ark. (32)'nin yaptığı bir çalışmada ise 55 nozokomiyal menenjit olgusunun 13'ünde *Acinetobacter* türleri izole edilirken, izole edilen tüm etkenler arasında ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir.

Üriner sistem infeksiyonları:

Genellikle yaşlı, yoğun bakım ünitesinde kalan, uzun süreli sonda takılan erkek hastalarda görülmektedir (7).

Savaş ve ark. (33), toplum kökenli ve nozokomiyal üriner sistem infeksiyonu etkenlerini araştırmışlar ve *Acinetobacter* türlerini nozokomiyal etken olarak %2.3, toplum kökenli infeksiyon etkeni olarak %0.9 oranında bulmuşlardır. Kibar ve ark. (34) ise, Ocak 1999 ve Aralık 2000 periyodu boyunca idrar kültürlerinde üreyen bakterileri araştırmışlar ve *Acinetobacter* türlerinin genel ortalamasını %4 olarak bulurken, yatan hastalar arasında bu oranı %5, ayaktan hastalar arasında ise %2 olarak saptamışlardır.

Diğer infeksiyonlar:

Klinik olarak diğer etkenler ile gelişen endokarditlerden ayrılamayan endokardit, periton diyalizi ile ilişkili peritonit, perkütan transhepatik kolanjiografi ve perkütan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, pankreas ve karaciğer abseleri, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen tiflit, osteomyelit, travma sonrası ekstremitte infeksiyonu, travma ve keratoplasti sonrası oftalmik infeksiyonlar bildirilen diğer nadir olgulardır (7).

Chim ve ark. (35), yanık yoğun bakım ünitesinde 5 yılda görülen nozokomiyal infeksiyonları incelemişler ve en sık etken olarak *Acinetobacter* türlerini bildirmişlerdir. Davis ve ark. (36), Irak'ta yaralanan 23 askerin yara kültürlerinde *A.calcoaceticus-baumannii complex* saptamışlar ve bu hastaların 15'inde osteomyelit, 3'ünde derin yara infeksiyonu ve 2'sinde yanık yarası tanımlamışlardır. Bachmayer ve ark. (37), AIDS'li bir hastada follikülit etkeni olarak *A.baumannii* izole etmişlerdir. Levy ve ark. (38) ise keratoplastiden sonra gelişen korneal greft ülser ve endoftalmit olgularını bildirmişlerdir.

2.1.6. *Acinetobacter* İnfeksiyonlarında Tedavi

Acinetobacter cinsi bakteriler *A.lwoffii* dışında birçok antibiyotiğe direnç geliştirmişlerdir. *A.lwoffii* diğerlerinden daha duyarlı iken en dirençli tür *A.baumannii*'dir. Genel olarak penisiline, ampisiline, sefalotine ve çoğunlukla kloramfenikole dirençlidirler. 2. ve 3. kuşak sefalosporinlere ve trimetoprim-sulfametoksazole karşı değişken

duyarlılıkları vardır. Son yıllarda *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere, kinolonlara ve karbapenemlere direnci de kapsayan çoğul dirençli suşlar bildirilmiştir (1, 18).

Çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kombine antibiyotikler kullanılmaktadır (20). Aminoglikozid'in tikarsilin veya piperasilin ile kombinasyonu sinerjik etkilidir ve ciddi infeksiyonlarda efektiftir (1). Çeşitli çalışmalarda çoğul dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarında sulbaktamın, ampisilin veya sefaperazon ile kombinasyonunun klinik etkisi gösterilmiştir. Sulbaktamın, aminoglikozid veya rifampin veya azitromisin ile kombinasyonları imipenem duyarlı suşlarda sinerjik etkilidirler. Sulbaktam ve sefalosporin kombinasyonunun yararı ise kısıtlıdır. Sulbaktamın *A.baumannii*'ye karşı etkili olmasına rağmen, diğer beta laktamların etkisini artırmazlar. Kinolon ile beta laktam veya imipenem ile aminoglikozid gibi kombinasyonların da imipenem duyarlı suşlara karşı sinerjik etkileri vardır. İmipenem veya meropenem ampisilin/sulbaktam ile beraber kullanıldığında karbapenem dirençli suşlara karşı etkili olabilmektedirler (20).

Çoğul dirençli suşlara etkili antibakteriyel ajanlardan biri de kolistindir (1). İmipenem dirençli *A.baumannii* suşlarında sulbaktama da direnç bildirilince tek tedavi seçeneği polimiksinler olmuştur. Polimiksinler 1950 ile 1980 yılları arasında kullanılmış olsa da, nefrotoksisite, nörotoksisite ve nöromusküler blokaj yaptığı, yeni ve daha güvenli antimikrobialer bulunduğu için kullanımdan kalkmıştır. Son çalışmalarda ise bu yan etkiler daha az sıklıkta bulunmuştur. Kolistinin etki mekanizması; bakteri dış membranındaki lipopolisakkaritler ile elektrostatik ilişkiye girerek bakteri hücre membranında düzensizlik yapmasıdır. Kolistin, lipopolisakkarit moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve permeabilitenin bozulması ile bakterinin ölümüne neden olmaktadır (39). Son yıllarda çoklu dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *A.baumannii* infeksiyonlarında tedavide tekrar kullanılmaya başlanmış ve rifampin, meropenem, azitromisin gibi başka antibiyotikler ile kombine kullanılmıştır (20, 39). Polimiksin B ile rifampin veya imipenem ya da üçünün kombinasyonu OXA-23 yapanlar dışında imipenem dirençli suşlara karşı sinerjik etkili olmaktadır. Bu kombinasyonlarda kolistinin dış membranın hızla permeabilizasyonuna ve diğer ajanların hücre içine girişine izin verdiği düşünülmektedir (20). Çoğul dirençli suşlara bağlı gelişen nozokomiyal pnömonilerde bu antibiyotiğe klinik yanıt %25-73 arasında değişebilmektedir. Bakteremilerde ise bu oran %66-88 arasındadır ve daha

etkilidir. Özellikle VİP'lerde inhalasyon yolu ile de verilebilmekte ve menenjitlerde intraventricüler veya intratekal uygulanabilmektedir (39).

Çoklu dirençli *A.baumannii*'ye karşı önemli ajanlardan biri de tigesiklidir. Tigesiklin'in *A.baumannii*'ye karşı in vitro aktivitesi çok iyidir (20, 40). Tigesiklin minosiklin türevi glisiklin grubundan bir antibiyotiktir ve tetrasikline karşı bakterilerin geliştirdikleri iki önemli direnç mekanizmasından etkilenmez. Pompa mekanizması için tigesiklin zayıf substrattır ve bakteri ribozomlarına tetrasiklinin bağlanmasını engelleyen Tet(M) proteinin neden olduğu değişiklikten tigesiklin etkilenmez (39, 41). Polimiksin B'den sonra *A.baumannii*'ye en etkili ilaçtır (40). Karbapenemaz üreten *Acinetobacter* suşlarına karşı etkili bulunmuştur (39).

Yeni bir karbapenem olan doripenem de *A. baumannii*'ye karşı umut verici bir antibiyotiktir, fakat OXA-23 ve IPM-4 yapan suşlara karşı etkili değildir (20).

2.1.7. *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu

Bugün *Acinetobacter* cinsi bakterilerin birçok ilaca dirençli olmaları, genetik değişikliklere uygun olduğu kadar antibiyotiklere karşı çabuk direnç geliştirebilme yeteneklerine bağlanmaktadır. Son zamanlarda karbapenem duyarlı ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz yapan *A.baumannii* izolatlarında 40'dan fazla direnç geni saptanmış ve bu suşların genetik değişkenliği gösterilmiştir. Bu özelliği bu bakteriye antibiyotik baskısı devam ettiği sürece çeşitli direnç mekanizmalarından faydalanma yeteneği vermektedir (2). Bundan 30 yıl kadar önce birçok antibiyotiğe duyarlı bir bakteri iken bugün çoklu dirençli bir bakteri haline gelmişlerdir. Direnç geliştirirken çeşitli mekanizmalardan faydalanmaktadırlar ve aynı izolatta birkaç direnç mekanizması bulunabilmektedir (21, 22). Birçok bölgede *Acinetobacter* türleri aminoglikozidlere, sefalosporinlere, florokinolonlara dirençli bulunmuşlardır. Sonuç olarak ampirik tedavi problemleri bir hal almış ve relapslar daha yaygınlaşmıştır (22).

Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları:

Tanımlanan direnç mekanizmaları şunlardır;

A-Beta laktamaz ile hidroliz

B-Dış membran proteinlerinde (OMP) ve penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik

C-Efflux pompa aktivitesinin artması (2, 20).

A.Beta-laktamazlar

β -laktam halkası içeren antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının en önemlisidir. Penisilinler, sefalosporinler ve benzer şekilde β -laktam halkası içeren antibiyotikleri hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimler penisilinler, 1. kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanlara kısıtlı etki göstermektedirler. 1980'li yıllardan itibaren genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanların tedavi amaçlı yaygın olarak kullanımları sonucunda, bu ana beta-laktamaz enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak yeni enzimler gelişmiştir. Bunlar genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardır. Şimdiye kadar 200'ün üzerinde GSBL tanımlanmıştır (42). Çoğu GSBL enterik Gram negatif bakterilerin plazmid kökenli beta laktamazlarından (TEM-1, TEM-2, SHV-1) köken almaktadırlar ve bu ana enzimlerin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi ile oluşmaktadırlar (42, 43, 44).

GSBL'ler geniş spektrumlu sefalosporinleri (Örneğin: sefotaksim, seftazidim), monobaktamları hidrolize edebilirler ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilebilirler (42, 45, 46). Sefamisinlere (sefoksitin, sefotetan) etkili olmamaları ile AmpC tipi beta laktamazlardan ayrılırlar. Bu durumun istisnaları da olabilmektedir. Örneğin TEM-52 moksolaktam ve sefotetani hidrolize edebilmektedir (42).

Beta-laktamaz üretiminden sorumlu genler kromozomlar, transpozonlar ve plazmidler de olabilirler. Bunlardan en önemlisi plazmidlerde yerleşik olan direnç genleridir. Çünkü bu genler plazmidler ile konjugasyon yolu ile mikroorganizmalar arasında kolayca aktarılabilirler. Ayrıca GSBL üreten suşlar, aynı zamanda aminoglikozidler, fluorokinolonlar ve kotrimoksazol gibi diğer antibiyotiklere de dirençli olabilmektedirler. Bunun nedeni GSBL'yi kodlayan genler ile aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME) gibi direnç genlerinin aynı birleşik plazmidde kodlanması ve bir suştan diğerine birlikte geçebilmeleridir (45).

Beta-laktamazlar fonksiyonlarına göre (Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması) veya yapılarına göre (Ambler sınıflaması) sınıflandırılmışlardır (45, 46). Bu enzimleri Bush-

Jacoby-Medeiros Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır. Grup 1'de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar, Grup 2'de beta-laktamazlar ile inhibe olan penisilinazlar, sefalosporinazlar, geniş spektrumlu beta-laktamazlar, Grup 3'de metalloenzimler, Grup 4'de klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar yer almaktadırlar. GSBL'ler fonksiyonel Grup 2b'ye yerleştirilmişlerdir (45). Amblerin sınıflandırmasına göre de beta-laktamazlar 4 gruba ayrılmışlardır. Sınıf A, C, D proteinler aktif bölgelerinde serin içerirken, sınıf B proteinler çinko-bağımlı metalloenzimlerdir (47). OXA-tipi enzimler istisna olmak üzere GSBL'ler Class A'da yer almaktadırlar (48).

Günümüzde GSBL'ler aminoasit sekanslama sonuçlarının karşılaştırılması temeline dayanan yapısal özellikler ve evolüsyon açısından 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadırlar. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır (42, 45).

Class A Beta Laktamazlar

TEM Kökenli GSBL'ler

TEM-1 plazmid kökenli olup bilinen en eski GSBL'dir. Ampisilin, penisilin, ve 1. kuşak sefalosporinlere dirence neden olmaktadır. Bu enzimin yapısında 12 farklı pozisyonda olan aminoasit değişiklikleri, 100'ün üzerinde TEM kökenli GSBL'nin ortaya çıkmasına neden olmuştur (42, 43, 45). Bunların bir kısmı sayıları 20'den fazla olan (43) 'inhibitör dirençli TEM (IRT)' türünde enzimlerdir ve geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmedikleri için GSBL olarak kabul edilmezler. Aynı zamanda IRT türü enzimler sulbaktam ve klavulanik asit'in etkilerine karşı dirençlidirler. Ancak tazobaktam bu enzimleri inhibe edebilmektedirler.

TEM kökenli GSBL'ler en sık *E.coli*, *K.pneumoniae*'de tanımlanmışlardır. Ancak *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *P.aeruginosa* gibi enterik ve non-enterik diğer pek çok bakteride bulunabileceği bildirilmiştir (42, 43, 45). IRT'ler de en sık *E.coli*'de, daha az sıklıkta ise *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter* türlerinde tanımlanmıştır (42, 45). İtalya'da *A.baumannii* suşlarında TEM-92 bulunmuştur (20).

SHV Kökenli GSBL'ler

SHV-1 en sık *K.pneumoniae*'de bulunmaktadır. Sayıları 50 civarındadır. Bunlardan SHV-10 'inhibitör dirençli' özellik göstermektedir (42, 45). Çin'de *A.baumannii* suşlarında

SHV-12 tanımlanmıştır ve Hollanda'da SHV-12 ve TEM-116 saptanmıştır (20). Ayrıca SHV üreten *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri ile salgınlar bildirilmiştir (48).

CTX-M Tipi GSBL'ler

Bu enzimler TEM ve SHV beta-laktamazlar ile en fazla %40 benzerlik göstermektedirler (45). En çok *Salmonella typhimurium* ve *E.coli*'de olmakla beraber, diğer bazı enterik bakterilerde de gösterilmiştir. 30'un üzerinde tipi tanımlanmıştır. Bu enzimler özellikle sefotaksimi (seftazidime göre daha iyi) hidrolize etmektedirler (42, 45). Ayrıca 1. kuşak sefalosporinlere benzilpenisiline göre daha etkilidirler (42). Bir başka özelliği sulbaktam veya klavulanata göre tazobaktam ile daha iyi inhibe olmalarıdır (45). Japonya'da beyin ve sinir cerrahisi servislerindeki epidemik *A.baumannii* suşlarında bulunmuştur (20).

PER tipi enzimler (Pseudomonas Extended Resistance)

İlk olarak 1993 yılında Fransa'da hospitalize edilen bir Türk hastada izole edilen *P.aeruginosa* suşunda saptanmıştır (46). Penisilinler, sefotaksim, seftazidim ve aztreonama direnç sağlarken karbapenem ile sefamisinlere etkisizdirler. Aktiviteleri klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olmaktadır (46, 48). PER grubu enzimler özellikle seftazidim olmak üzere aminotiazolil sefalosporinlere direnç sağlarlar (20, 42). Penisilinler bu enzimler için zayıf substrattırlar. Bir bakterinin PER-1 enzimi taşıyor olması mortalite açısından belirleyici olarak saptanmıştır (42, 45). Grubun diğer üyesi PER-2 ise PER-1 ile %86 aminoasit homolojisi göstermektedir ve 1996 yılında Arjantin'de *S.typhimurium* izolatlarında ve daha sonra *S.enterica*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E.cloacae*, *Vibrio cholerae*, *A.baumannii* gibi diğer Gram negatif bakterilerde tanımlanmıştır (42, 45, 46). PER-1 sıklıkla Türkiye ve Kore'den bildirilirken, PER-2 Güney Amerika'dan bildirilmiştir. PER-1'den nokta mutasyonu ile türeyen PER-3 ise Fransa'da *Aeromonas caviae*'den identifiye edilmiştir (46).

Türkiye'de PER-1 genleri *Acinetobacter* türleri ve *P.aeruginosa*'da yaygın olmakla beraber *S.typhimurium* ve *Providencia rettgeri*'de de izole edilmiştir (42, 46). PER-1 üreten mikroorganizmalar başta Türkiye olmak üzere Kore'de yaygın olarak görülmekle birlikte Fransa, İtalya, Belçika gibi ülkelerden de rapor edilmişlerdir (48).

Class B Beta Laktamazlar

Karbapenemazlar

Metallo beta laktamazlar plazmid kontrollüdürler. Aktif bölgelerinde çinko içerirler ve karbapenemlere direnç gelişimine neden olurlar (20, 43). Özellikle *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, daha az sıklıkta *Klebsiella* spp., *Serratia marcescens*'de tanımlanmışlardır (43).

A.baumannii izolatlarında IMP ve VIM tipi metallo-beta-laktamazlar bildirilmiştir (49). Japonya ve Hong Kong'da IMP tipi (IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-11), Kore'de ise VIM-2 tipi metallo beta laktamazlar, Seul'de ise yeni bir metallo-beta laktamaz olan SIM-1 tanımlanmıştır (2, 20). Birçok metallo beta laktamaz transpozonlar üzerinde class 1 integronda bulunmaktadır (2).

Class C Beta Laktamazlar

AmpC Tipi Enzimler

Tüm *A.baumannii* suşlarında kromozomal sefalosporinazlar (AmpC) yaygındır (43, 49). AmpC enzimleri substrat olarak sefalosporinleri tercih etmektedirler. Beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler. 1989 yılından sonra kromozomal AmpC beta laktamazlara ek olarak plazmid kontrolünde AmpC'ler tanımlanmaya başlanmıştır. FOX, LAT, MIR, MOX, BIL, CMY olarak isimlendirilmişlerdir. Bunlar da penisilinlere ve sefalosporinlere direnç oluşturmaktadırlar. *Enterobacter*, *Citrobacter*, *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*'de gözlenmiştir. Plazmid kontrolünde AmpC beta laktamaz sentezleyen mikroorganizmalar genelde beta laktam tedavisi alan, altta yatan hastalığı olan, immun sistemi baskılanmış kişiler ve yoğun bakım hastalarından izole edilmiştir (43). Yeni tanımlanan sınıf C enzimler günümüzde *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak adlandırılırlar [Acinetobacter-Derived Cephalosporinases (ADCs)] ve yeni yapılan çalışmalarda yedi adet ADC Amp C geni tanımlanmıştır. Bu enzimler sefepim ve karbapenemlerin dışında dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler ile penisilinleri hidrolize ederler (2, 20).

Class D Beta Laktamazlar

OXA Tipi Enzimler

Ambler moleküler sınıflamasında D grubunda yer almaktadırlar. Oksasiline afiniteleri yüksektir. Karbapenemleri inaktive ederler. Beta laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf inhibe edilirler. Bu enzimlerin çoğu OXA-2 ve OXA-10 kökenlidirler.

Esas olarak seftazidime yüksek direnç gösteren *P.aeruginosa* izolatlarında olmak üzere *A.baumannii* suşlarında da tanımlanmıştır (42). Karbapenemaz aktivitesi de olan bu enzimlerden *A.baumannii* suşlarında ilk OXA-23 tanımlanmıştır (42, 45). Bu plazmid kaynaklı enzim başlangıçta ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) olarak adlandırılmıştır ve İngiltere, Brezilya, Kore, Çin, Singapur'da ortaya çıkmıştır. Plazmid kaynaklı diğer bir enzim olan OXA-58 ise Fransa, Arjantin, İspanya, Türkiye, Romanya, Avusturya, Yunanistan, Kuveyt, İskoçya'da bulunmuştur. OXA-40 ve OXA-58 taşıyan *A.baumannii* suşları, Amerika Birleşik Devletlerinde salgınlara neden olmuşlardır. Diğer karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazların kromozomal ilişkili enzimler olduğu düşünülmektedir (20, 42). OXA-17 ise farklı olarak sefotaksim ve seftriaksona direnç sağlamaktadır (42).

Diğer GSBL'ler

Bunlar içinde oksiminino sefalosporinlere, özellikle seftazidim ve aztreonama direnç gelişimini sağlayan VEB-1, CME-1, TLA-1 sayılabilir. VEB-1, CME-1, TLA-1, PER-1 ve PER-2 birbirleri ile ilişkilidirler ve %40-50 homoloji gösterirler (42, 45). VEB-1 Fransa ve Belçika'da hastane salgınlarda etken olarak bildirilmiştir (20, 18).

B- OMP ve PBP Değişimi

Porin veya OMP değişimi ile antibiyotiklerin periplazmik alana geçişi azalmakta ve penisilin bağlayan protein ile bağlanamamaktadır. Periplazmik alana beta-laktamın girişi azalınca da beta-laktamazın aktivitesi artmaktadır (49). Yapılan çalışmalarda carO tarafından kodlanan 29 kDa'luk dış membran proteininde azalmanın karbapenem direncinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (20, 49).

İmipenem dirençli *A.baumannii* suşlarına bağlı gelişen birçok salgın porin kaybına bağlı olmaktadır (2, 49). Aynı zamanda porin kaybına AmpC, OXA-24 gibi enzimlerin yapımı da eşlik edebilmekte ve sonuçta karbapenemlere direnç gelişmektedir.

PBP-2'nin eksik ifadesi karbapenemlere direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır (2).

C- Efflux Pompası

Farklı antibiyotik sınıflarına karşı direnç gelişimine neden olan tek mekanizmadır. Bakteri hücresi için toksik maddeleri protonlar ile değiş tokuş yaparak dışarı atar. Efflux pompasının 3 kısmı vardır: sitoplazmik membranda uzanan pompa, çıkış portu ve ikisi arasında bulunan lipoprotein. Efflux'un doğal rolü, sitoplazmik membran için zararlı olabilecek kimyasalları ortadan kaldırmaktır. Aynı zamanda bu pompa beta-laktamları, kinolonları ve bazen aminoglikozidleri aktif olarak kovarak antibiyotiklere direnç gelişiminde rol alabilmektedir (49).

A.baumannii'de AdeABC efflux pompası iyi tanımlanmıştır ve aminoglikozit, sefotaksim, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, trimetoprim ve fluorokinolonları etkilemektedir. AdeABC'nin aşırı yapımı karbapenemlere direnç ile sonuçlanabilmektedir. Son zamanlarda yeni bir efflux pompası olan AbeM tanımlanmış olmakla birlikte bu pompanın spektrumu fluorokinolonlar ile sınırlıdır (2, 20). Tanımlanan diğer bir pompa RND-tipi efflux pompasıdır. AdeB'nin inaktivasyonu yolu ile aminoglikozidlere dirençten sorumlu olmakta ve kinolonlara, tetrasiklinlere, kloramfenikole, eritromisine, trimetoprim ile etidyum bromide direnci de kapsamaktadır (49).

Aminoglikozidlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Aminoglikozidler *A.baumannii* tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ama 1970'lerden beri artan sıklıkta dirençler bildirilmiştir. *A.baumannii* türlerinde aminoglikozidlere en sık direnç mekanizması antibiyotiğin hidroksil veya amino gruplarının AME ile (aminoglikozid fosfotransferaz, asetiltransferaz ve adenilattransferaz) modifikasyonudur. Bu enzimler antibiyotiklerin sitoplazmik membrandan transportları sırasında yapısını değiştirerek onları inaktive ederler (44, 49). Birçok AME başka direnç determinantları ile beraber integronlarda veya diğer mobil genetik elemanlarda bulunmaktadırlar (47).

Diğer bir mekanizma ise hedef ribozomal proteinlerin değişimi ve antibiyotiğin bakteri hücresi içine efflux pompası ile yetersiz girişidir. Bu efflux pompası florokinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikol, trimetoprim gibi diğer ilaçlara duyarlılığın düzeyini etkilemektedir (2, 18, 20).

Kinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları

Kinolonların *Acinetobacter* suşlarına karşı aktiviteleri geniş spektrumlu sefalosporinler ve aminoglikozitlere göre daha iyi olmasına rağmen klinik izolatlarda hızla direnç gelişmiştir. Direnç gelişimi DNA giraz veya topoizomeraz IV yapısında değişimle ilişkilidir ve DNA girazı kodlayan *gyrA* ve topoizomeraz IV'ü kodlayan *parC* genlerinde mutasyonlar bundan sorumludur. *gyrA* mutasyonu ile DNA'da süpersarmal oluşumu inhibe olmakta ve ayrıca antibiyotiğin bağlanma bölgesindeki yapısal değişiklikleri de indüklemektedir. *ParC* mutasyonları ise *gyrA* mutasyonu varlığında görülmekte ve duyarlılıkta ileri derece azalma ile sonuçlanmaktadır (44). Böylece ilacın enzim-DNA kompleksine afinitesi azalmaktadır (2, 18, 20, 49).

Diğer bir direnç mekanizması da kromozomal olarak kodlanan influx ve efflux sisteminin mutasyonudur. Bu mutasyon ile kinolonların içeri alınımına aracılık eden spesifik OMP yapımının azalmasına veya efflux sisteminin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır. Böylece ilaç dışarı atılmaktadır (2, 18, 20).

Şimdiye kadar plazmid aracılı kinolon direnç geni olan *qnrA* *A.baumannii*'de saptanamamıştır (2, 49).

Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Tetrasiklin 30S ribozomal subüniteye bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etkili olmaktadır (18). Tetrasikline 2 farklı mekanizma ile direnç gelişebilmektedir: efflux pompası veya ribozomal koruma sistemi. Tetrasiklin direnç genleri plazmid veya transpozonlarda bulunmaktadır. Farklı tetrasiklin direnç determinant sınıfları tanımlanmış ve sınıflanmıştır. Bunlardan A-E sınıfları Gram negatif bakteriler arasında sık görülmektedir. *A.baumannii* suşlarında TetA ve TetB determinantları tanımlanmıştır (2, 18, 20). TetA ve TetB transpozon ilişkili efflux pompasıdır ve TetB tetrasiklin ve minosikline, TetA ise minosikline etkilidir.

Diğer mekanizma ise ribozomal koruma proteindir ve ribozomu tetrasiklinin etkisinden korur (2, 20). Bu proteini *tet(M)* geni kodlamaktadır ve *S.aureus*'un Tet(M) proteini ile %100 homologtur. Yukarıdaki mekanizmalar tigesikline etkisizdir. Tigesiklin plasmid kaynaklı flavin bağımlı monooksijenaz olan TetX için substrattır ve şimdiye kadar *A.baumannii* izolatlarında bu enzim saptanamamıştır. Bir çalışmada tigesikline karşı dirençte AdeABC efflux pompa sisteminin etkisi olduğu gösterilmiştir (2, 20).

Polimiksine Karşı Direnç Mekanizmaları

Polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) çoklu ilaca dirençli *A.baumannii*'nin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde son şans olarak kullanılmasına rağmen günümüzde kolistine karşı direnç bildirilmeye başlanmıştır.

Dış membranın yapısal değişimi kolistin direncinden sorumludur (49). Bu değişim bakterinin lipopolisakkaritinin asidifikasyonu veya antibiyotiğin hücre membranına bağlanmasını engelleyen antijen varlığı şeklinde olmaktadır (2, 20). Ancak polimiksin direncinin mekanizmasını yeterli tanımlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (49). Yunanistan'da yapılan bazı çalışmalarda kolistine karşı direnç bildirilmiştir ve bu suşların sadece tigesikline duyarlı olması tedavi açısından endişe vericidir (2).

Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

A.baumannii kloramfenikol ve trimetoprim-sufametoksazole karşı ileri derecede dirençli olmakla birlikte bu direncin genetik temeli hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bir çalışmada *Acinetobacter*'lerde kloramfenikol direncinin nedeni, kloramfenikol asetiltransferaz 1 (CAT1) sentezi olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise CAT1 aktivitesi gösterilememiş ve antibiyotiğe geçirgenliğin değişimi veya hedef proteinde mutasyon olabileceği belirtilmiştir.

Sulfonamidlere karşı direnç, dihidropteroat sentazın plazmidler ile dirençli hal alması ile olmaktadır. Trimetoprim direncinden, plazmid DNA'sı tarafından taşınan *dhfr* geni sorumludur. Dihidrofolat redüktaz enziminin trimetoprime afinitesi azalmıştır (18).

2.1.8. PCR

PCR, moleküler biyolojide uygulanan bir tekniktir ve basitçe nükleik asitlerin tüpte çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), daha sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon-çift iplikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem ile hedef bölge birkaç saat içinde milyonlarca sayıda çoğaltılabilmektedir (50-52).

2.1.9. Hastane İnfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi

Hastaneye yatan kişiler altta yatan nedenlerden dolayı infeksiyonlara yatkınlık göstermekte ve hastane ortamı dirençli mikroorganizmaların infeksiyonları için zemin hazırlamakta ve yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane infeksiyonları hastane masraflarını önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı hastane kaynaklı infeksiyonlarda korunma ve kontrol çok önemlidir.

Hastane infeksiyonları sporadik, endemik, epidemik olarak görülebilirken en sık endemik infeksiyonlara rastlanmaktadır ve kontrol önlemleri bu gruba uygulanmaktadır. Endemik infeksiyonların 1/3 kadarı çapraz bulaşma ile meydana gelmektedir. Hastane infeksiyonları için epidemiyolojik araştırmalar, belirli bir patojen ile infeksiyon sıklığı arttığı zaman, bir hasta grubunda aynı tür bakteri izole edildiği zaman veya belirli antibiyotik duyarlılık paterni gösteren suşlar belirlendiği hallerde başlatılmaktadır. Moleküler mikrobiyolojik yöntemler hastane infeksiyonlarının etkenlerinin bulaşma yollarını, bulaşma mekanizmalarını ortaya koymada önemli katkılarda bulunmaktadır. Klonalitenin (aynı biyotip, benzer genotip, ortak virülans faktörlerine sahip aynı tür üyeleri) varlığını veya yokluğunu belirleyen moleküler teknikler infeksiyonların yayılımını izlemede oldukça etkilidir. Moleküler yöntemler infeksiyonların hızlı tanısında, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanmasında, antibiyotik direnci saptanmasında, infeksiyonların izleminde, hastane infeksiyonları epidemiyolojisi konusunda yeni açılımlar sağlamıştır (53).

Tablo 2. Hastane infeksiyonu etkenlerini tiplendirme yöntemleri (53).

1. Fenotipik yöntemler	2. Genotipik yöntemler
a. Biyotipleme b. Serotipleme c. Antibiyotik duyarlılık paterni d. Bakteriyofaj tiplene e. Bakteriyosin tiplene f. Protein analizi	a. Plazmid analizi b. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi: RFLP, PFGE c. Ribotipleme d. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler: REP-PCR, AP-PCR e. Sekans analizi (Tek lokus sekans analizi, multilokus sekans analizi) f. "Microarray"-DNA "chip" teknolojisi

2.1.10. RAPD PCR

Moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde, genetik polimorfizmi saptamak için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Son on yılda, en sık kullanılan moleküler teknik, PCR dayalı olan rastgele artırılmış polimorfik DNA tekniğidir (54). Williams ve ark. (55) RAPD'yi, Welsh ve McClelland (55) ise arbitrary primed PCR (AP-PCR)'ı geliştirmişlerdir. RAPD ve AP-PCR orijinal olarak genetik haritalama, taxonomi ve filogenide kullanılmaktadır.

Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilmiş bir veya daha fazla primer ile DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmekte ve önceden DNA baz dizisinin bilinmesi gerekmemektedir (48, 54, 56).

Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunlukta (baz çifti) bantların oluşmasına neden olmaktadır. Kullanılan primerler genelde 9-10 bazlık kısa primerlerdir ve G-C 'den zengindirler (en az %40 G+C içermelidir). Bağlanma ısısı 40-50⁰C'ye düşürülmüştür. Bağlanma sırasında primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgül bölgelere hem de diğer bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içinde farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine uzaklıkları farklı olduğu için, jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklı olmaktadır. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde bir mutasyon gerçekleşirse bant polimorfizmi ortaya çıkmaktadır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleri ile karşılaştırılarak, aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edilmektedir (56).

Bu yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. Yöntemin uygulanması kolaydır ve kısa sürede sonuç verebilmektedir (54, 56). Oldukça duyarlı bir tekniktir, çok az bir örnek bile çalışma için yeterli olmaktadır. Ucuz bir yöntemdir (55). Bu yöntemin dezavantajı ise henüz standardizasyonun sağlanamamasıdır. Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için M13 ("wilde type faj M13"ün kor diziliminden hazırlanmış) olarak bilinen universal primer kullanılmalı, standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler'da standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm salgın izolatları aynı anda çalışılmalı ve sonuçlar en az 3 kez tekrarlanmalıdır (54, 56).

2.1.11. Jel Elektroforezi

Günümüzde laboratuvarlarda amplifiye DNA ve RNA'nın saptanması ve karakterizasyonu için agaroz jel elektroforezi, Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Southern blotting gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu prosedürlerin yapımı kolay, oldukça ucuz ve kısa sürede uygulanabilmektedirler.

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, çapraz bağlı galaktopiranozdan oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. İçindeki pirüvat ve sülfat agaroz ile ilişkili DNA'nın ayrılma özelliğinin çoğundan sorumludurlar. Elektroforez sırasında agaroz hareketsiz ve negatif yüklüdür ve içindeki pozitif iyonlar hareket ederek katoda doğru göç etmektedirler. DNA fosfat içeriğinden dolayı negatif yüklü olduğu için anoda doğru hareket eder. Bu arada su, pozitif iyonlar ile beraber hareket ederek, DNA moleküllerinin anoda doğru göçüne engel olmaktadır. DNA moleküllerinin göçü büyüklüklerine bağlıdır. Küçük moleküller daha hızlı hareket ederler. Jel içinde agarozun yüksek konsantrasyonu DNA moleküllerinin hareketini güçleştirir. Agaroz oranı arttıkça daha küçük moleküller ayrılır. DNA molekülleri büyüdükçe Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi özel elektroforez teknikleri gerekmektedir.

Jelde kullanılan agaroz tipi ve konsantrasyonu DNA fragmanlarının büyüklüğüne bağlıdır. Ayrıca jele yüklenebilecek DNA volümü, kuyucuğun kapasitesine, DNA miktarına ve DNA moleküllerinin büyüklüğüne, DNA moleküllerinin büyüklük dağılımına, elektroforez için kullanılan voltaj gradientine bağlıdır. DNA molekül büyüklüğü arttıkça jelin DNA kapasitesi azalmaktadır. 1000 bp altındaki DNA molekülleri için yüksek voltajlar daha uygun iken, 1000 bp üstündeki moleküller için daha düşük voltajlar uygundur.

Agaroz jel elektroforezi yapmak için bir jel havuzu, jel tarağı (jelde kuyucuklar açmak için), agarozu eritmek için mikrodalga fırın ve elektroforezi yapmak için güç kaynağı gerekmektedir.

Bu yöntemde jel ve elektroforez için 2 tampon seçeneği vardır. Bunlar, TAE (Tris-Asetat, EDTA; 40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA), TBE (Tris-Borat, EDTA; 89 mM Tris-borat, 2mM EDTA) olup, genellikle konsantre çözeltiler olarak hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanırlar. Her iki tamponun pH'sı 7'den daha büyüktür. TAE, 12 kb'dan

büyük DNA moleküllerinin elektroforezi için kullanılırken, TBE, daha küçük (1kbdan küçük) DNA moleküllerinin elektroforezi için tercih edilmelidir. TBE'nin agaroz ile etkileşimi ile daha küçük porlar oluşmaktadır.

Örnek yükleme tamponları olarak bromfenol mavisi ve Ksilen syanol FF boyaları kullanılabilir. Amaç örneğin dansitesini artırmaktır ve jele yüklemeye önce DNA örneklerine eklenmektedir.

Agaroz jelde DNA'yı görüntülemek için en çok kullanılan etidyum bromiddir. Etidyum bromid çift zincirli DNA içine girmekte ve kırmızı renkte floresan yaymaktadır. DNA'ya bağlandığı zaman floresanı 20-30 kat artırmaktadır. DNA etidyum bromid ile boyandığında, 300 nm transilluminasyon ile 1 ile 5 ng arası çift zincirli DNA içeren bant saptanabilmektedir. Etidyum bromid elektroforez öncesi jele eklenebilir veya elektroforez sonrası jel boyanabilir. Eğer elektroforez öncesi eklenirse DNA hareketini etkilemekte ve %15 yavaşlatmaktadır. Önce boyamanın bir diğer sakıncası zeminin fazla boyanabilmesidir.

Kullanılabilecek diğer boyalar ise SYBR Green I, GelStar, Metilen mavisi, Gümüş boyadır. SYBR Green I ve GelStar, etidyum bromid'den daha duyarlı olmalarının yanında daha pahalı boyalardır. Metilen mavisi ile DNA UV aydınlatmasız görülebilir. Nontoksiktir, ama etidyum bromid'den 40 kez daha az duyarlıdır ve ancak büyük DNA miktarları varsa kullanılabilir. Gümüş boya, genelde poliakrilamid jelde proteinleri boyamak için kullanılırken, agaroz jelde de kullanılabilir (57).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na kliniklerden gönderilen kan kültürlerinde üreyen *A.baumannii* izolatları çalışmaya alındı. Aynı hastadan birkaç kez *A.baumannii* izole edilmiş olsa bile bu suşlardan sadece biri çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamız 07102019 nolu proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Fakültemiz Etik kurulundan 23.07.2007 tarih ve 2007/158 sayılı kararlar onay alınmıştır.

3.1. BAKTERİ İZOLASYONU

Hastadan uygun koşullarda deri antiseptisi sağlanarak vacutainer yardımı ile alınan ve BD BACTEC PLUS + Aerobic/F kan kültür şişesine inoküle edilen örnekler BACTEC 9240 Aerobik/F (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Towson, Md) otomatik kan kültürü cihazına yerleştirildi. Pozitif sinyal veren şişeler kanlı agar ve Eozin Metilen Mavisini (EMB, Oxoid) besiyerine pasaj yapılarak 18-24 saat 35-37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2. ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARININ TANIMLANMASI

Üreyen bakteriler konvansiyonel yöntemlerle tanımlendi. EMB besiyerinde laktoz ve oksidaz negatif bakterilere Gram boyaması yapıldı. Gram negatif kok/kokobasil şeklinde boyanan bakteriler, TSI, Simons sitrat besiyeri, hareket besiyeri ve İndol testi için buyyona ekildi. TSI besiyerinde dipte ve yatıkta alkali reaksiyon veren, Simons sitrat besiyerinde üreyerek besiyerinin rengini maviye dönüştüren, hareket besiyerinde hareketsiz olarak tespit edilen, İndol testi negatif bakterilerin *Acinetobacter spp.* olabileceği düşünüldü. Daha sonra Phoenix 100 BD Otomatize Sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks) ile bu suşların otomatize tip tayini yapıldı. Daha sonra çalışma sürecine kadar %20 gliserollü Brain Heart İnfüzyon besiyerine alınarak -20 °C'de saklandı.

3.3. *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ SEFTAZİDİM'E DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Çalışmaya başlamadan önce saklama besiyerinden EMB besiyerine bakterilerin canlandırma pasajı yapıldı ve daha sonra tek koloniden pasaj tekrarlandı. PER-1 varlığını seftazidim dirençli suşlarda araştıracağımız için, suşların seftazidime duyarlılıkları E-test yöntemi ile araştırıldı. Steril serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland standardına uygun bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar steril eküvyonlar ile Mueller Hinton agara yayıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve seftazidim E-test stripleri (AB BİODİSK) yerleştirildi. 16-18 saatlik inkübasyondan sonra üreme zonunun strip ile keşiştiği nokta Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak kaydedildi. MİK değeri ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ ise duyarlı, 8-32 $\mu\text{g/ml}$ arasında ise orta duyarlı ve ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ ise dirençli olarak değerlendirildi.

3.4. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için bakteriler EMB besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen *A.baumannii* izolatların ve kontrol amaçlı Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Haluk Vahaboğlu'ndan temin ettiğimiz PER-1 pozitif *Pseudomonas aeruginosa* suşların, DNA izolasyonu için ticari bir kit olan Qiagen Minikit (QIAGEN, United Kingdom) kullanıldı. İzolasyon üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

- Bakteriler, besiyerinden bir öze dolusu kadar, 180 μl Buffer ATL içeren 1.5 ml'lik bir tüpe alındı ve süspansiyon haline getirildi.
- Üzerine 20 μl Proteinase K eklendi ve vortekslendi.
- 56°C'de ara ara vorteksleyerek çözülmesi beklendi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için kısa bir santrifüj uygulandı.
- Örneğin, üzerine 200 μl Buffer AL eklendi ve 15 saniye vortekslenip 70°C'de 10 dk. beklendi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları indirmek için kısa bir süre santrifüjlendi.
- Örneğin, üzerine 200 μl %96 etanol eklendi ve 15 saniye vortekslenildikten sonra kısa bir süre santrifüj edildi.

- 5 dk. bekleddikten sonra QIAamp Spin kolonu 2 ml'lik temiz bir tüpe yerleştirildi ve elde edilen karışım spin kolona aktarıldı.
- Kolonun kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve sıvının biriktiği toplama tüpü atıldı. QIAamp Spin kolonu ise 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonun kapağı açılıp tüpün çeperine değmeden 500µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Sıvı biriken toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonun kapağı açılıp tüpün çeperine değmeden 500µl Buffer AW2 eklendi ve 13000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Sıvı biriken toplama tüpü atıldıktan sonra kolon yeni bir toplama tüpüne tekrar yerleştirildi ve 13000 rpm'de 1 dk. tekrar santrifüjlendi.
- Sıvı biriken toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 200µl Buffer AE eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk. bekleddikten sonra 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Son aşamada Spin kolon atılarak tüpte biriken sıvı PCR çalışması için -20°C'de saklandı.

3.5. PER-1 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

İzole ettiğimiz DNA örneklerinde PER-1 varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı. Amplifikasyon 50µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışım örneği; MgCl₂ (25mM), dNTP (2mM), Taq Polimeraz enzimi (5U/ml)(Fermentas), 100 pmol PER-1 F (5'-GTA GTT ACT GCC TCG ACG CT-3'), PER-1 R (5'-TCA AAT TGA TAC GCA GTC TGA-3'), 10X PCR buffer, dH₂O ve izole edilen DNA örneği olacak şekilde hazırlandı.

MgCl ₂	4µl
dNTP	5µl
Taq Polimeraz enzimi	0.4µl
Primer F	0.2µl
Primer R	0.2µl

10X PCR Buffer	5µl
dH ₂ O	33.2µl
DNA örneği	2µl

Bu elde ettiğimiz miks primerlerimize uygun DNA parçalarını çoğaltmak için GeneAmp 9700 PCR (Applied Biosystems, USA) cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen amplifikasyon programı uygulandı.

Amplifikasyon için ısı döngü cihazı (thermocycler) programı

Denatürasyon	95°C'de	5 dakika	} 35 siklus
Denatürasyon	94°C'de	30 saniye	
Primer bağlanması	57°C'de	1 dakika	
Primer uzaması	72°C'de	2 dakika	
Primer uzaması	72°C'de	10 dakika	

PCR sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için jel elektroforezi yapıldı.

3.6. AGARUZ JELİN HAZIRLANMASI VE ELEKTROFOREZ

Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin gözlenmesi için jel elektroforez yapıldı. Bunun için aşağıda işlemler sıra ile yapıldı.

- 2 gr. agaroz 100 ml 1X TBE (pH 8.3) tamponu içeren erlen içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
- Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak sıcaklığa gelinceye dek soğumaya bırakıldı.
- Çözelti içerisine jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için etidyum bromid eklendi (stok solüsyon: 10 mg/ml) ve tamamen karışması sağlandı.
- Jel tankına taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan agaroz çözeltisi döküldü ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı.
- Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel havuzuna jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.

• Kuyucuklara, 6µl amplifikasyon ürünü, 2µl bromfenol mavisi (6XLoading Dye Solution, Fermentas) ve 1µl etidyum bromür ile karıştırılarak mikropipet yardımıyla yüklendi. Ayrıca DNA örnekleri ile beraber bir adet marker (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder) ve PER-1 pozitif kontrol jel kuyucuklarına aynı şekilde yüklendi.

• 100 V'da 1 saat elektroforez yapıldı.

• Süre sonunda ethidyum bromid içeren jel, tanktan alınarak jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak) bantların varlığı gözlemlendi.

Pozitif DNA örneğinin karşısına denk gelen bantlar (872 bp) PER-1 bantları olarak değerlendirildi. Bu örneklerin PER-1 genomu taşıdığı kabul edildi.

3.7. RAPD PCR YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

PER-1 varlığı saptanan suşların klonal ilişkili olup olmadığını saptamak için RAPD PCR yöntemi uygulandı (55, 58, 59). Protokol gereği, önce 2X Amplifikasyon karışımı hazırlandı. Bunun için toplam hacim 1000 µl olacak şekilde, 10X PCR Buffer, dNTP miks (2 mM), MgCl₂ (25 mM) ve dH₂O aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırıldı.

2X Amplifikasyon karışımı:

10X PCR Buffer	200µl
dNTP miks	200µl
MgCl ₂	320µl
dH ₂ O	280µl

Daha sonra RAPD PCR amplifikasyonu için karışım hazırlandı. Reaksiyon karışım örneği; 2X Amplifikasyon karışımı, M13 Primeri (100 pmol/µl) (M13 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), TaqDNA polimeraz (5 U/µl) (Fermentas) ve PER-1 pozitif örneklere ait izole DNA örnekleri olacak şekilde hazırlandı. Karışımın toplam miktarı her örnek için 50 µl olacak şekilde dH₂O eklendi.

RAPD PCR Amplifikasyon Karışımı:

2X Amplifikasyon karışımı	25µl
M13 Primeri	1µl

TaqDNA polimeraz	0.5µl
dH ₂ O	21.5µl
PER-1 pozitif izole DNA	2µl

Hazırlanan karışım GeneAmp 9700 PCR (Applied Biosystems, USA) cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki amplifikasyon programı uygulandı.

Denatürasyon	94°C'de 5 dakika	} 2 siklus
Primer bağlanması	40°C'de 5 dakika	
Primer uzaması	72°C'de 5 dakika	
Denatürasyon	94°C'de 1 dakika	} 40 siklus
Primer bağlanması	40°C'de 1 dakika	
Primer uzaması	72°C'de 2 dakika	

Bir adet marker [Φ X174 DNA/BsuRI(HaeIII), Fermentas] ile beraber amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin her birinin 6 µl'si 2µl bromfenol mavisi (6XLoading Dye Solution, Fermentas) ve 1µl etidyum bromür ile karıştırılarak daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan %2 agaroz jele yüklendi. İçinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankına alınan jel, önce 1 saat 100V'da ve daha sonra 1 gece 50 V'da elektroforeze tabi tutuldu. Oluşan bantlar jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak) incelenerek fotoğraflandı.

3.8. DENDOGRAM

RAPD PCR yöntemi ile oluşan DNA bantları arasındaki klonalite ilişkisi için dendogram yapıldı. Dendogram için Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) analiz programı kullanıldı. Bantlar arasındaki benzerlikler "dice smilarity coefficients"e göre hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışmaya rutin kan kültürlerinde üreyen 100 *A.baumannii* suşu alındı.



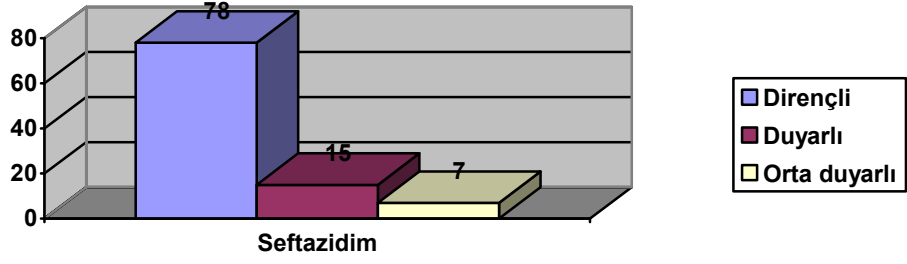
Resim 1: EMB besiyerinde *A.baumannii* kolonilerinin görünümü (Çalışmamızdan).

Çalışmaya alınan hastaların servislere göre dağılımı (Tablo 3)'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Hastaların kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Hasta sayısı
Nöroloji	34
Göğüs Hastalıkları	19
İç Hastalıkları	16
Reanimasyon	10
Kalp Damar Cerrahisi	9
Acil Servis	6
Beyin ve Sinir Cerrahisi	3
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	2
Göğüs Cerrahisi	1
Toplam	100

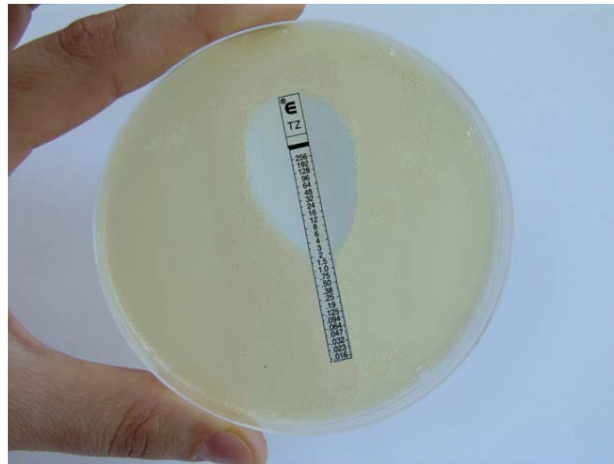
E test yöntemi ile çalışmaya alınan tüm suşların seftazidim duyarlılıkları belirlendi. 100 suşun 78'i (%78) dirençli bulunurken, 7'si orta duyarlı ve 15'i duyarlı bulundu (Grafik 1).



Grafik 1: *A.baumannii* suşlarının E-test yöntemi ile seftazidime duyarlılıkları.

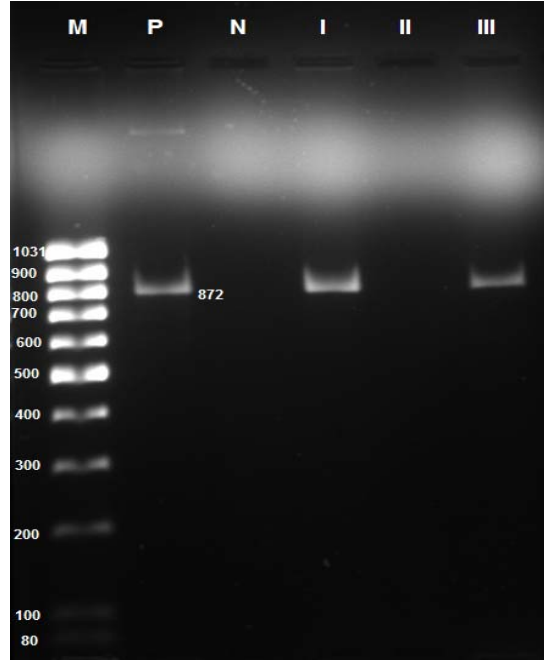


Resim 2: E test yöntemi ile seftazidim dirençli bir *A.baumannii* suşu (Çalışmamızdan).



Resim 3: E test yöntemi ile seftazidim duyarlı bir *A.baumannii* suşu (Çalışmamızdan).

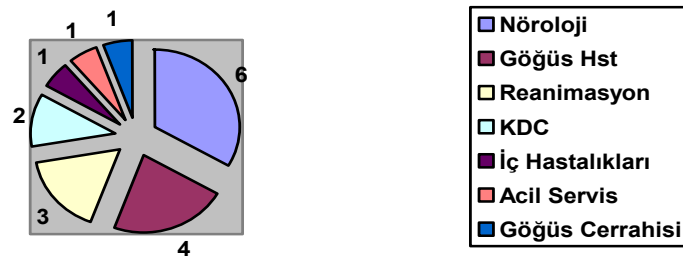
E test sonuçlarına göre seftazidim'e dirençli (%78) ve orta duyarlı (%7) olan toplam 85 suşta PER-1 pozitifliği araştırıldı. Orta duyarlı suşlarda PER-1 pozitifliğine rastlanmadı. 78 adet seftazidime dirençli suşun PCR analizine göre 18 suşta PER-1 geni saptandı (%23) (Resim 4).



Resim 4: PER-1 bantlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (Çalışmamızdan).

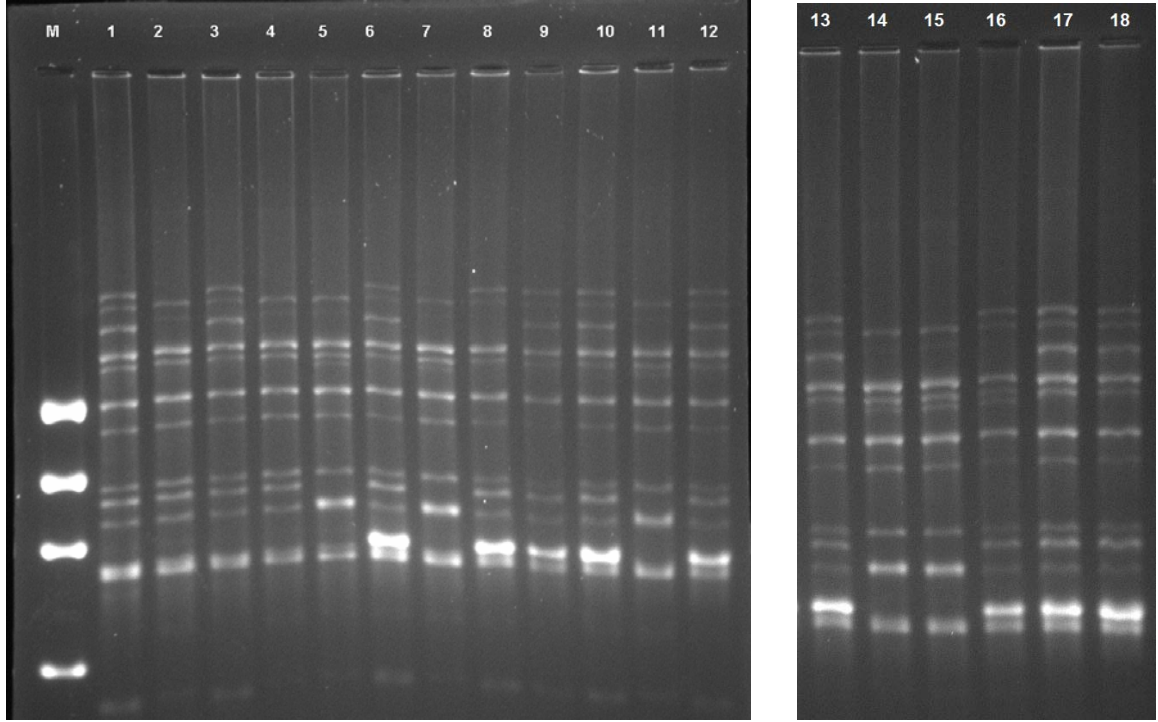
(M: marker, P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, I: PER-1 bandı, II: negatif bir örnek, III: PER-1 bandı)

PER-1 pozitif suşların görüldüğü klinikler incelendiğinde nöroloji servisinde 6 hastada pozitiflik saptandı. Bunu sırasıyla göğüs hastalıkları (4), reanimasyon (3), kalp damar cerrahisi (2), iç hastalıkları (1), acil servis (1), göğüs cerrahisi(1) izledi (Grafik 2). Beyin ve sinir cerrahisi ile çocuk sağlığı ve hastalıkları servislerinde PER-1 enzimi saptanamadı.



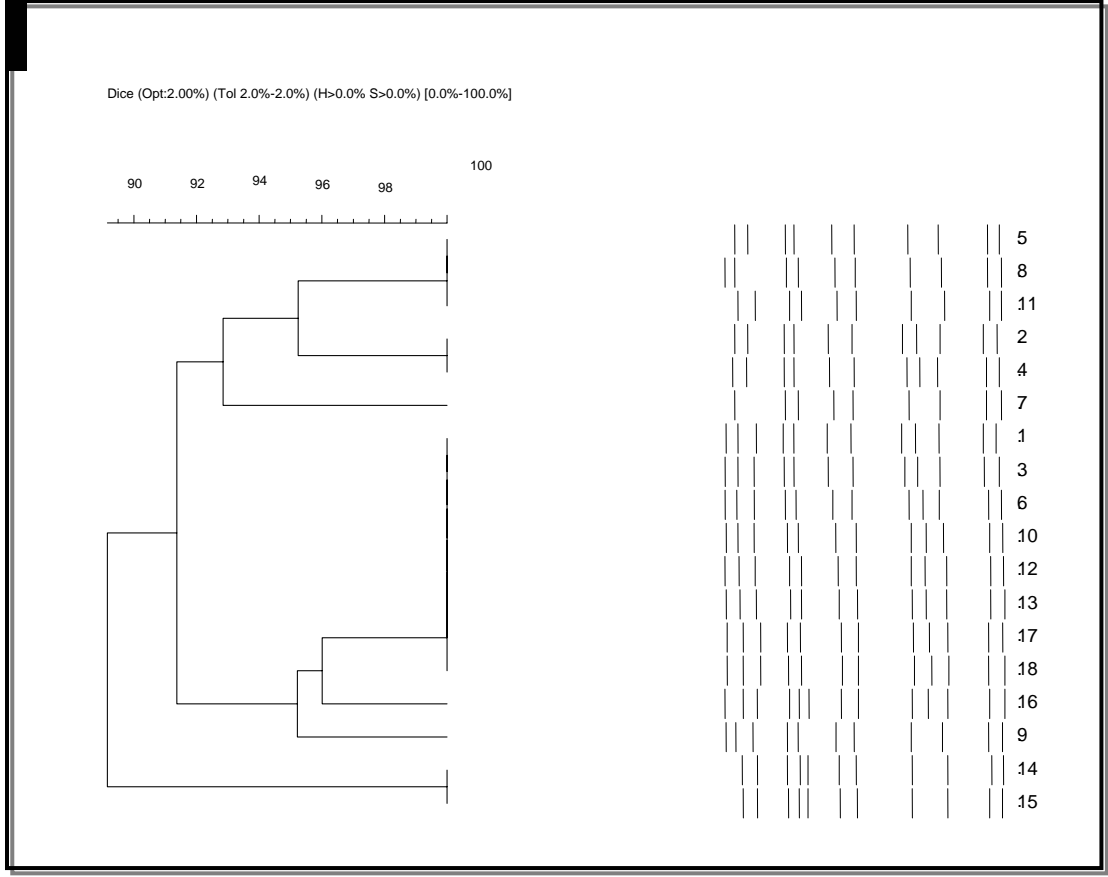
Grafik 2: PER-1 pozitif suşların kliniklere göre dağılımı.

RAPD-PCR yöntemi ile 18 adet PER-1 pozitif suşun klonal ilişkisine bakıldı. Bu amaçla Qiagen Minikit (QIAGEN, United Kingdom) kullanılarak izole edilen ve hazırlanan amplifikasyon karışımı GeneAmp 9700 PCR (Applied Biosystems, USA) cihazına yerleştirilerek uydun programda çoğaltılan DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yürütüldü ve oluşan bantların fotoğrafı çekildi (Resim 5).



Resim 5: Jel elektroforezde oluşan bantların Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (Çalışmamızdan). (M: marker, 1-18 PER-1 pozitif örnekler)

Elektroforezde oluşan bantların Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) programı kullanılarak dendogramı yapıldı. Bantlar arasındaki benzerlikler "dice similarity coefficients"e göre hesaplandı. Buna göre PER-1 pozitif tüm suşlar birbiri ile ilişkili bulundu. Bunlar içinde 5, 8, 11 numaralı suşların, 2 ile 4 numaralı suşların, 1, 3, 6, 10, 12, 13, 17, 18 numaralı suşların, 14 ile 15 numaralı suşların kendi aralarında %100 benzer olduğu görüldü (Resim 6).



Resim 6: PER-1 taşıyan izolatların dendogramı (Çalışmamızdan).

Klonlar arası ilişkiyi açıklayabilmek amacı ile hastaların yattığı servisler incelendiğinde hastaların farklı dönemlerde benzer kliniklerde yattığı belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4: PER-1 taşıyan suşların izole edildiği hastaların yattığı servisler.

PER-1 Pozitif İzolat No	Hastanın Yattığı Servisler
1	Plastik Cerrahi Servisi Göğüs Hastalıkları Servisi
3	Göğüs Hastalıkları Servisi
6	Ortopedi Servisi İntaniye Servisi Reanimasyon Ünitesi Nefroloji Servisi Kalp ve Damar Cerrahisi Servisi Nefroloji Servisi
10	Göğüs Cerrahisi Servisi
12	Kardiyoloji Yoğun Bakım Servisi Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
13	Göğüs Hastalıkları Servisi Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
17	Çocuk Kardiyoloji Servisi Kalp ve Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi
18	Kardiyoloji Yoğun Bakım Servisi Kalp ve Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi
14	Acil Yataklı Ünite Nöroloji Servisi
15	Nöroloji Servisi
5	Beyin ve Sinir Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
8	Reanimasyon Ünitesi
11	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
4	Kardiyoloji Servisi Nefroloji Servisi Acil Yataklı Ünite Nöroloji Servisi Nefroloji Servisi Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
2	Kardiyoloji Servisi Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
7	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
9	Reanimasyon Ünitesi Acil Yataklı Ünite
16	Acil Yoğun Bakım Servisi Beyin ve Sinir Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi Reanimasyon Ünitesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastane ortamında bulunan bakterilerin toplum kaynaklı infeksiyon etkeni olan bakterilere oranla daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bunun da en önemli nedenlerinin son 35-40 yıl içinde geliştirilen antibiyotiklerin hastane ortamında yaygın olarak kullanılması, invaziv girişimler ve yeni tedavi olanakları ile hastaların sağ kalım oranlarının artması olduğu düşünülmektedir (60).

Gram negatif bakteriler hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olan etkenlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (60). Bu bakterilerden biri de *Acinetobacter* türleridir, bunlardan da en sık etken *A.baumannii*'dir. Son yıllarda *Acinetobacter baumannii* antibiyotiklere artmış bir direnç göstermekte, hastanelerde ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde çoklu ilaca dirençli infeksiyonlara ve inatçı nozokomiyal salgınlara neden olmaktadır (61, 62). Özellikle de mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda ciddi pnömonilere neden olmaktadır (60, 63). Hastane ortamında sık ve geniş çapta antibiyotik kullanımı çoklu dirençli suşların yayılımını kolaylaştırmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir (61, 44). Mikroorganizma cansız çevrenin her tarafından izole edilebilmektedir. Toprak ve suda saptanabilmekte ve hastanelerde uzun bir süre, 3 yıla kadar, yaşayabilmektedir (62). Sunenshine ve ark. (64)'nın yaptıkları bir çalışmada çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* suşları ile infekte olan hastaların hem yoğun bakım ünitesinde hem de hastanede kalış sürelerinin uzadığını ve bu suşlar ile infekte hastalar arasında mortalite oranlarının artma eğiliminde olduğunu ortaya koymuşlardır. Lee ve ark. (65), yaptıkları çalışmada, çoklu ilaca dirençli *A.baumannii*'ye bağlı bakteremi olgularında mortalite oranının daha yüksek olduğunu ve tıbbi harcamaların daha da arttığını vurgulamışlardır.

Antibiyotik direnç paternleri hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanede farklı servislerde değişiklikler gösterebilmektedir. Ampirik tedavide klinisyenlere yol gösterici olması amacıyla direnç patenlerinin ortaya konması önemlidir. Antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direnci arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir. Özellikle hastanelerde antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımı sonucu dirençli suşların seleksiyonuna bağlı olarak hızla direnç gelişebilmektedir. Bununla beraber kullanımı kısıtlanan antibiyotikler ise bir süre sonra yeniden etkin hale gelebilmektedir (66). Birden fazla antibiyotiğe direnç gelişimi de son derece hızlıdır. *A.baumannii*'de antibiyotiklere direnç gelişiminde rol alan mekanizmalar birden fazladır. Bunlar GSBL yapımı, AME salgılaması, PBP'lerde değişiklik, OMP'de değişiklikler olarak sıralanabilir (60).

Gram negatif bakteriler içinde β -laktam antibiyotiklere dirençte en yaygın mekanizma β -laktamaz yapımıdır. Bunlar arasında GSBL'ler klinik olarak önemli bakteriler arasında yaygınlığı ile ve oksimino β -laktamlara direnç geliştirmeleri ile büyük kaygı yaratmaktadır. GSBL'lerin çoğu TEM veya SHV'den gelişmekle birlikte bu grubun dışında enzimler de vardır. Bu enzimlerden biri de ülkemizde özellikle nonfermentatif Gram negatif çomaklarda yaygın olan PER-1'dir. PER-1 ilk olarak 1991 yılında Fransa'da bir Türk hastada izole edilen *P.aeruginosa* suşunda identifiye edilmiş, daha sonraki çalışmalarda *S.typhimurium*, *A.baumannii* gibi bakterilerde de saptanmıştır (67, 68). Ülke çapında yapılan bir çalışmada PER-1'in Türkiye'de yaygın olduğu ortaya konmuştur. Daha sonra ilk Fransa'dan olmak üzere Avrupa'nın farklı bölgelerinden ve Kore'den PER-1 üreten suşlar bildirilmiştir (67, 69). PER-1, penisilinler, sefotaksim, seftazidim ve aztreonama direnç sağlamaktadır. Vahaboğlu ve ark. (70), yaptıkları çalışmada PER-1 tip enzim taşıyan suşların seftazidim ve gentamisine oldukça dirençli olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda 100 suşdan 78'i seftazidime dirençli bulunmuştur.

Hujer ve ark. (71), Walter Reed Army Medical Center'da tedavi gören 75 hastada izole ettikleri *Acinetobacter* türlerinde çoklu ilaç direnç fenotipinden sorumlu olan antibiyotik direnç genlerini araştırmışlar ve PER-1 enzimini %3 oranında pozitif bulmuşlardır. Bu oran düşük olmakla birlikte, Amerika'da ilk defa tanımlanması açısından önemlidir. Szabo ve ark. (72), öncesinde Mısır'da bir hastanede yatıp daha sonra Macaristan'a transfer edilen ve yatışı sırasında hastanın örneklerinde PER-1 pozitif *P.aeruginosa* ile PER-1 pozitif *A.baumannii* üreyen bir olgu bildirmişlerdir. Bu Macaristan'dan bildirilen ilk PER-1 olgusu olmakla birlikte, direnç mekanizmalarının ülkeler, hatta kıtalar arası yayılımının önemini de ortaya koymaktadır. Pagani ve ark. (73), İtalya'da 6 farklı hastaneden elde edilen nozokomiyal salgınlar ile ilgili olan, geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli 44 adet *P.aeruginosa* izolatının 20'sinde PER-1 genini pozitif bulmuşlardır. Bu PER-1 geni taşıyan suşların çoklu ilaca dirençli olduklarını, 1995-2000 yılları arasında 9 bağımsız salgına neden olduklarını göstermişlerdir (73). Yong ve ark. (74), Kore'de yaptıkları bir çalışmada, 2001 ve 2002 yılları arasında iki farklı hastanede izole edilen 97 *Acinetobacter* spp. suşunun 53'ünde (%54,6), PCR yöntemi ile PER-1 enziminin varlığını göstermişler ve bu çalışma ile bu enzimin Türkiye dışında da yüksek oranda bulunabileceğini kanıtlamışlardır.

PER-1, oksimino sefalosporinlere karşı aktivitesinin yüksek olması ve patojen bakteriler arasında yayılmasından dolayı klinik açıdan önemli bir enzimdir (67, 73).

Daha önceki çalışmalar PER-1 taşıyan suşlar ile gelişen nozokomiyal infeksiyonların daha zor tedavi edildiğini ve hastaların mortalitelerini artırdığını ortaya koymuşlardır (64, 65). Jeong ve ark. (75), bir yoğun bakım ünitesinde, tek bir PER-1 pozitif *A.baumannii* klonu ile infekte 10 hastadan oluşan bir salgını incelemişler ve PER-1 taşıyan suşlar birçok antibiyotiğe dirençli olduğu için, bu suşlara bağlı gelişen infeksiyonların tedavisinin PER-1 taşımayanlardan daha problemlili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Vahaboğlu ve ark. (76), PER-1 pozitif *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinin etken olduğu hastalıkların kliniğinin daha kötü olduğunu göstermişler ve mortalite artışının PER-1 taşıyan suşların klonal yayılımına ve PER-1 taşıyan klonun yüksek virülansına bağlı olabileceğini vurgulamışlardır.

A.baumannii oportunistik bir patojen olarak nozokomiyal infeksiyonların geniş bir kısmına neden olmaktadır. Bazı *A.baumannii* suşlarının hastane içinde yayılma potansiyeli olduğu için, bu infeksiyonların çoğu nozokomiyal salgın sırasında görülmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında epidemik potansiyeli olan *A.baumannii* izolatlarının çabuk ve doğru saptanması kontrol önlemlerinin alınması açısından önemlidir. Bu suşların kolonize olabilmeleri, hastane ortamında yaşayabilmeleri, antibiyotiklere dirençli olmaları yayılmalarına katkıda bulunan faktörlerdir. Epidemik *A.baumannii* izolatları sporadik olanlardan çok daha dirençlidir ve herhangi bir çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* suşunun nozokomiyal salgın yapma potansiyeli vardır (77).

Mathai ve ark. (78), *A.baumannii* infeksiyonlarının epidemiyolojisini saptamak için, hastane kaynaklı respiratuvar infeksiyonlarda izole edilen 27 izolatı, random amplified polymorphic DNA profili kullanılarak ve antibiyotik duyarlılıklarına bakarak tiplendirmişlerdir. RAPD'ye göre 10 farklı patern ve 14 izolatın ise tek bir suş profili gösterdiğini tespit etmişler ve buna dayanarak hastanede farklı klonların bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı RAPD paterninde farklı antibiyogram ve farklı genetik tiplerin aynı antibiyogram paterni göstermesi ile, bir salgının identifiye edilmesinde RAPD gibi PCR'a dayalı yöntemlerin önemini kanıtlamışlardır. Ayrıca hastanede farklı kısımlarda spesifik suş tiplerine bağlı görülen infeksiyonlar, tiplendirmenin infeksiyon kontrol önlemlerinin etkinliğini değerlendirmede de yardımcı olabildiğini göstermişlerdir (78). Wroblewska ve ark. (79), nöroşirurji yoğun bakım servisinde yatan 7 hastada *A.baumannii*'ye bağlı gelişen menenjit salgınının kaynağını araştırmak için RAPD-PCR ve AFLP (amplified fragment

length polymorphism) yöntemlerini kullanmışlardır. Bu genotipik yöntemler ile epidemik suşun servisinde çevresel kaynaklı olduğunu bulmuşlardır (79).

Zarilli ve ark. (80), İtalya'da 2003 Haziran ve 2004 Haziran arasında 3. basamak bir hastanede çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* salgınının moleküler epidemiyolojisini araştırmışlar. 74 hastadan izole ettikleri 45 adet suşun genotipik analizine göre 2 farklı Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) paterni göstermişlerdir. Bunlardan patern 1, 44 hastadan izole edilen izolatlarda saptanırken, bu paternin 2002'de aynı şehirde başka bir hastanede izole edilen epidemik *A.baumannii* klonu ile aynı olduğunu bulmuşlardır (80). Wilks ve ark. (81), Londra'da bir hastanenin yoğun bakımında 9 hastadan izole edilen *A.baumannii-calcoaceticus* suşlarını PFGE ile tiplendirmişler. Bu suşları birbirlerinden ve Londra'da 2000 yılında yapılan bir çalışma sırasında saptanan epidemik suştan ayırt edememişlerdir. Denton ve ark. (82), İngiltere'de bir hastanenin nöroşirurji yoğun bakım ünitesinde, 10 hastada PER-1 pozitif *A.baumannii* salgını tanımlamışlardır. Hastalardan izole edilen suşlar ile servis ortamından izole edilen suşların %46'sının aynı olduğunu saptamışlar ve salgını servisi kapatarak, tam bir temizlik protokolü uygulayarak durdurulabilmişlerdir (82). Aynı şekilde Longo ve ark. (83), İtalya'da bir hastanenin yoğun bakım servisinde meydana gelen *A.baumannii* salgınına incelemişler ve PFGE ile hem hastalardan hem de çevreden izole edilen suşların tek bir klona ait olduğunu bulmuşlardır. Ancak infeksiyonun tek bir kaynağı olmadığı için etken suşun eradikasyonu için kontakt izolasyonu, agresif çevre temizliği, uygun tedavinin düzenlenmesi gibi geniş çaplı uygulamalar gerekmiştir (83). Yong ve ark. (74), 2001 ile 2002 yılları arasında izole edilen 97 *Acinetobacter* spp. suşunun 53'ünde PER-1 varlığını göstermişler ve bu suşların PFGE ile genotipik analizlerine göre 23 farklı patern saptamışlardır. Bu, birçok klonun varlığını göstermekle beraber, A paterni gösteren 16 izolatın 9 tanesinin ve O paterni gösteren 8 izolatın 7 tanesinin yoğun bakım orijinli olması klonal yayılımı göstermektedir (74).

Endimiani ve ark. (84), seftazidime dirençli 26 *P.aeruginosa*'ya bağlı kan akım infeksiyonu olan olguyu incelemişler, bunların 9'unda PER-1 enzimini pozitif bulmuşlardır. Bu PER-1 pozitif suşların neden olduğu infeksiyonların tedavisinin daha zor ve bu hastaların hastane giderlerinin daha fazla olduğunu ortaya koymuşlar ve ayrıca ciddi *P.aeruginosa* infeksiyonlarında GSBL yapımının belirlenmesi ve zamanında bildirilmesinin önemli olduğunu belirtmişlerdir (84). Pagani ve ark. (73), 44

adet *P.aeruginosa* izolatın 20'sinde PER-1 genini pozitif saptamışlardır. PER-1 geni taşıyan bu suşların o bölgede endemik olarak bulduklarını ve çeşitli nozokomiyal salgınlar ile ilişkili olduklarını ortaya koymuşlar, hastaneler arası klonal yayılım gözlemlenmesine rağmen, PFGE ile PER-1 taşıyan suşların klonal farklılığını göstermişlerdir (73).

Alp ve ark. (58), 1 yıl boyunca Erciyes Üniversitesi Hastanesi'nde nozokomiyal kan kültürü infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Acinetobacter* türlerinin RAPD-PCR ve PFGE ile genotipik analizini yapmışlar ve 41 *A.baumannii* suşunun %80'inin (32 hasta) genotip 3'e ait olması ve bu 32 hastanın %75'inin (24 hasta) yoğun bakımda bulunması çapraz yayılımı düşündürmüştür. Akalın ve ark. (85), Uludağ Üniversitesi Hastanesi'nde, Haziran 2000 ve Haziran 2003 arasında 3 yıl içinde izole edilen 120 *A.baumannii* suşunu (klinik örneklerden 103, çevre kültürlerinden 10, Mayıs 2003 ve Aralık 2003 tarihleri arasında yoğun bakım havasından 7 izolat) RAPD-PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Genetik değişimi araştırmak için 3 periyotta çalışmışlar ve çalışma sırasında 12 farklı genotip saptarlarken, en yaygın genotipleri A, B, C, D olarak belirlemişlerdir. İlk periyotta en sık A olmak üzere, A ve C genotipleri; ikinci periyoda da en sık A genotipi olmak üzere A, C, D genotipleri görülürken; son periyotta ise 9 yeni genotip ortaya çıkarken genotip A kaybolmuştur. Bu genotiplerin izole edildikleri servislere ve örneklerle göre analizleri, çevresel kontaminasyon, hava yolu ile yayılım, hasta transferi ve çapraz-kontaminasyonun hastanede *A.baumannii*'nin neden olduğu epidemilerde önemli olduğunu vurgulamışlardır (85). Kolaylı ve ark. (86), 7 farklı üniversite hastanesinin yoğun bakım ünitelerinden toplanan 84 *Acinetobacter* spp. suşunun %31'inde ve 92 *P.aeruginosa* suşunun ise %55.4'ünde PER-1 tipi enzimi pozitifliği bulmuşlar ve bu enzimin hala önemli bir sağlık problemi olduğunu belirtmişlerdir. Rastgele seçtikleri 7 adet *Acinetobacter* spp. ve 7 adet *P.euroginosa* suşunun RAPD analizine göre, her iki cins bakteri de multi-klonal bir yayılma göstermişlerdir (86). Aktaş ve ark. (87), 12 ay boyunca yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda izole edilen 49 seftazidim dirençli *P.aeruginosa* izolatında PER-1 ve OXA-10-like β -laktamaz varlığını araştırmışlar ve suşların %86'sında olmak üzere, oldukça yüksek bir oranda PER-1 geni saptamışlardır. Bu suşların klonal yakınlığını RAPD analiz yöntemi ile araştırmışlar ve 16 farklı band paterni bulmuşlardır. Ancak PER-1 pozitif suşların %60'ının 2 farklı paterne ait olduğunu göstermişler ve bu hastalar arasında klonal ilişkili izolatların yayıldığını saptamışlardır (87).

Güdücüoğlu ve ark. (88), yoğun bakımda yatan hastaların kan kültürleri ve bronşiyal aspiratlarından izole edilen *A.baumannii* suşlarını toplamışlar ve ekipmanlardan, personelin ellerinden ve eldivenlerinden, ayrıca hastaların çeşitli vücut bölgelerinden alınan örneklerin kültürünü yapmışlardır. Klinik örneklerden 8 ve tarama örneklerinden 18 suş identifiye etmişler ve AP-PCR ile biri 21 izolat, diğeri 5 izolatı kapsayan 2 tip ortaya çıkarmışlardır (88). Vahaboğlu ve ark. (70), Türkiye’de 8 farklı üniversite hastanesinden topladıkları *Acinetobacter*, *Klebsiella* ve *P.aeruginosa* izolatlarında PER-1 tipi β -laktamaz prevalansını ve moleküler epidemiyolojisini araştırmışlar, *Acinetobacter* suşlarında PER-1 tipi β -laktamazu 8 hastanenin 5’inde olmak üzere, %46 oranında bulmuşlardır. Bu suşların klonal benzerliğine baktıklarında, *P.aeruginosa* izolatlarında farklı klonlar bulurken, *Acinetobacter* türlerinde 2 farklı klon saptamışlardır. Bu enzimin Türkiye’de oldukça yaygın olduğunu ve farklı türler ve farklı klonlar arasında yayıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın, PER-1’in klonal çeşitliliği ve yüksek prevalansı ile enzimin yayılma potansiyelinin ne kadar fazla olduğunu yansıttığını düşünmüşlerdir (70). Eraç ve ark. (67), 1998 ile 2003 yılları arasında izole edilen 289 adet seftazidime dirençli Gram negatif bakteri suşunda PER-1 enzimi araştırmışlar ve 92 *A.baumannii* izolatının 33’ünde (%35.9) ve 117 *P.aeruginosa* izolatının ise %46.2’sinde PER-1 pozitifliği bulmuşlar ve istatistiksel olarak bu oranlar arasında anlamlı bir fark saptayamamışlardır. Yapılan PCR analizine göre, PER-1 pozitif *A.baumannii* suşları arasında tek bir band ile ayrılan, 2 farklı band paterni saptamışlar ve yüksek prevalansdan bu iki endemik klonun yayılmasını sorumlu tutmuşlardır (67).

Bizim çalışmamızda ise, yatan hastaların rutin kan kültürlerinde üreyen 78 adet seftazidim dirençli *A.baumannii* suşunun %23’ünde (18 suş) PER-1 geni pozitif saptanmıştır.

Her ne kadar bu enzimin Türkiye’de yaygın olduğu kabul görse de, artık birçok ülkede de az sayılmayacak sıklıkta görülebilmektedir. Örneğin, Pagani ve ark. (73), İtalya’da geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli 44 adet *P.aeruginosa* izolatının 20’sinde, Yong ve ark. (74), Kore’de yaptıkları bir çalışmada 97 *Acinetobacter* spp. suşunun 53’ünde (%54,6) PER-1 genini pozitif bulmuşlardır. Bu oranlar ülkemizde elde edilenlere çok yakın değerlerdir. PER-1 taşıyan bakterilerin Türkiye dışında da artmasının nedenleri, hastane ortamında sık ve yaygın antibiyotik kullanımı, bu mikroorganizmanın

hastane ortamında uzun süre yaşayabilmesi, ayrıca PER-1 geni taşıyan suşların hastaneler, şehirler, hatta ülkeler arasında yayılabilmesi olabilir.

Türkiye’de ise yapılan daha önceki çalışmalarda, sırasıyla, %31, %35.9, %46, %86 oranında PER-1 pozitifliği bildirilmiştir (67, 70, 86, 87). Bu değerler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz orandan (%23) daha yüksek olmakla birlikte birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu da göstermektedir ki, PER-1 oranı antibiyotik kullanım politikalarındaki veya enfeksiyon kontrol programlarındaki muhtemel farklılıklara bağlı olarak, farklı merkezler arasında değişebilmektedir. Çalışmaya aldığımız *Acinetobacter baumannii* suşlarının çoğunluğunun seftazidime dirençli olması ve hastanemizde bu izolatlarda PER-1 geninin pozitiflik oranının Türkiye genelinden daha düşük olması, ilaçlara direncin nedeni olabilecek başka direnç paternlerinin varlığını akla getirmektedir.

Çalışmamızda PER-1 taşıyan tüm suşlar, dendogram analizine göre birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar içinde 5, 8, 11 numaralı suşların, 2 ile 4 numaralı suşların, 1, 3, 6, 10, 12, 13, 17, 18 numaralı suşların, 14 ile 15 numaralı suşların kendi aralarında %100 benzer olduğu görülmüştür. Bu suşlar hastalardan aynı veya farklı servislerde yatarken izole edilmişti. Ancak hastaların aynı kliniklerde farklı dönemlerde yattığı ve *A.baumannii*’nin hastane ortamında uzun süre yaşayabildiği dikkate alınır, belli bir suşun klinikler arasında olası bir hasta transferi yolu ile dolaştığı kabul edilebilir bir ihtimaldir. Aktaş ve ark. (87), Eraç ve ark. (67), Güdücüoğlu ve ark. (88) da yaptıkları çalışmalarda PER-1 pozitif suşların 2 farklı band paterni gösterdiklerini, birbirleri ile klonal ilişkili olduklarını ve hastalar arasında bu izolatların yayıldığını, Kolaylı ve ark. (86) ise rastgele seçtikleri suşların RAPD analizine göre multi-klonal bir yayılma olduğunu göstermişlerdir.

PER-1 sıklığı ve suşlar arası klonal ilişkiyi araştırmak için Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmaların verileri Tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5: Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmaların verileri

	Yer	Yıl	Örnek	PER-1	Klonal İlişki	Klonaliteyi Saptamada Kullanılan Yöntem
Vahaboğlu ve ark. (70)	Türkiye (8 farklı üniversite hastanesi)	1997	55 <i>Acinetobacter</i> 104 <i>P.aeruginosa</i> 92 <i>Klebsiella</i> spp.	%60 %38 -	<i>A.baumannii</i> suşlarında %46 oranında 2 farklı klon bulunmuş <i>P.aeruginosa</i> suşlarında farklı klonlar	Diğer
Denton ve ark. (82)	İngiltere	1999	<i>A.baumannii</i> salgını	+	Hepsi aynı suş ve çevreden alınan örneklerin %46’sında epidemik suş saptanmış	PFGE
Mathai ve ark. (78)	Hindistan	2001	27 <i>A.baumannii</i>	-	10 farklı patern bulunmuş (14 izolatta tek suş profili)	RAPD
Yong ve ark. (74)	Kore	2003	97 <i>A.baumannii</i>	%54,6	PER-1 pozitif suşlarda 23 farklı patern saptanması yanında klonal yayılımda gösterilmiş	PFGE
Wroblewska ve ark. (79)	Polonya	2004	<i>A.baumannii</i>	-	Menenjit salgınına çevresel kaynaklı bulunmuş	RAPD ve Diğer
Pagani ve ark. (73)	İtalya (6 farklı hastanede)	2004	44 <i>P.aeruginosa</i>	%45	Multipl klonal yayılım olmakla beraber hastaneler arası klonal yayılım gözlemlenmiş	PFGE
Jeong ve ark. (75)	Kore	2005	PER-1 pozitif <i>A.baumannii</i> salgını	+	Salgının tek klondan kaynaklandığı gösterilmiş	PFGE
Kolaylı ve ark. (86)	Türkiye (7 farklı üniversite hastanesi)	2005	84 <i>A.baumannii</i> 92 <i>P.aeruginosa</i>	%31 %55,4	Multiklonal yayılım	RAPD
Aktaş ve ark. (87)	İstanbul Üniv.	2005	49 <i>P.aeruginosa</i>	%86	16 farklı patern belirlenmiş (Ancak PER-1 pozitif suşların %60’ında 2 farklı patern)	RAPD
Güdücüoğlu ve ark. (88)	Yüzüncü Yıl Üniv.	2005	26 <i>A.baumannii</i>		AP-PCR ile 2 tip saptanırken, PFGE ile tüm suşlar ilişkili bulunmuş	PFGE ve AP-PCR
Hujer ve ark. (71)	Amerika	2006	75 <i>A.baumannii</i>	%3	-	-
Wilks ve ark. (81)	Londra	2006	<i>A.baumannii</i>	-	Suşlar birbirleri ile ve 2000 yılında Londra’da görülen epidemik suş ile aynı	PFGE
Endimiani ve ark. (84)	İtalya	2006	26 <i>P. aeruginosa</i>	%34	-	-
Alp ve ark. (58)	Erciyes Üniv.	2006	41 <i>A.baumannii</i>		9 farklı genotip belirlenmiş (%80’i genotip 3’e ait)	PFGE ve RAPD
Akalın ve ark. (85)	Uludağ Üniv.	2006	120 <i>A.baumannii</i>		-12 farklı genotip bulunmuş -Çevresel kontaminasyon, hasta transferi, çapraz bulaş ve hava yolu ile hastane içinde yayılım	RAPD
Zarilli ve ark. (80)	İtalya	2007	45 <i>A.baumannii</i>		2 farklı patern saptanmış (Patern 1, 2002 yılındaki epidemik <i>A.baumannii</i> klonu ile aynı)	PFGE
Longo ve ark. (83)	İtalya	2007	<i>A.baumannii</i> salgını	-	Hasta örnekleri ile ortamdan izole edilen suşlar tek klona ait	PFGE
Eraç ve ark. (67)	İzmir	2007	92 <i>A.baumannii</i> 117 <i>P.aeruginosa</i>	%35,9 %46,2	Tüm PER-1 pozitif suşlarda tek bir band ile ayrılan 2 farklı band paterni	Diğer
Çalışmamız	Selçuk Üniv.	2008	78 <i>A.baumannii</i>	%23	Klonal ilişkili suşlar	RAPD

PER-1 gibi GSBL yapan suşların ortaya çıkması ve yayılması kaygı vericidir. Çünkü β -laktamların çoğuna direnç geliştirmekte ve bu suşlara bağlı infeksiyonların tedavisinde karbapenemler gibi sınırlı sayıda antibiyotik seçeneği kalmaktadır. Dolayısıyla karbapenemlerin kullanımı artmakta ve buna bağlı olarak bu antibiyotiklere direnç gelişme riski artmaktadır. Diğer Gram negatif bakterilerden farklı olarak sulbaktamın *Acinetobacter* türlerine bakterisidal etkili olması, çoklu dirençli infeksiyonlarında ampisilin-sulbaktam kombinasyonuna duyarlı bir aminoglikozid eklemek tedavide farklı bir seçenek olabilmektedir. Ancak PER-1 türü GSBL yapan suşların yaygın olmasına bağlı olarak sulbaktam kombinasyonlarına da duyarlılık azalmakta ve neredeyse tedavisi mümkün olmayan kökenler haline dönmektedirler (89).

Sonuç olarak, çalışmamızda Kore ve Türkiye’de elde edilen daha önceki verilerden daha düşük oranda PER-1 pozitifliği saptanmıştır. PER-1 oranı antibiyotik kullanım politikalarındaki veya infeksiyon kontrol programlarındaki muhtemel farklılıklara bağlı olarak, farklı merkezler arasında değişebilmektedir. Ancak çalışmamızdaki suşların çoğunun seftazidime dirençli olması, bu suşlarda farklı direnç genlerinin varlığını düşündürmektedir. PER-1 varlığı saptanan suşların RAPD analiz yöntemi ile klonal ilişkisini araştırdığımızda, dendogram analizine göre birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bu yöntem uygulanması kolay, kısa sürede sonuç verebilen, oldukça duyarlı, ucuz bir tekniktir. Ancak bu yöntem için henüz standardizasyon sağlanamamıştır. Bu nedenle sonuçların diğer bir moleküler epidemiyolojik yöntem ile doğrulanması tavsiye edilmektedir. Suşların klonal ilişkili olmaları, belli bir suşun klinikler arasında dolaştığı ihtimalini akla getirmektedir. Bu ihtimali doğrulamak için ek çalışmalar gerekmektedir. Çevreden, hastalardan, servislerin ortak kullandığı cihazlardan, hatta personelden alınan örneklerde *Acinetobacter baumannii* varlığı araştırılıp bunların da klonal ilişkilerine bakılarak, olası kaynak belirlenebilir. Bu bakterilerin birden fazla ilaca dirençli olmaları tedavide önemli sorunlar oluşturmaktadır. Antimikrobiklerin yoğun bakım ünitelerinde ve immun sistemi zayıflamış kişilerde kullanımı, çoklu dirençli suşların seleksiyonuna neden olmaktadır. Dirençte artış, sağlık harcamalarını yükseltmekte, morbidite ve mortaliteyi arttırmakta ve yeni patojenlerin ortaya çıkışına neden olmaktadır. Bu nedenler ile tedavi sorunu yaratan bu enzimin varlığının araştırılması ve suşlar arasında klonal ilişki olup olmadığının açığa çıkarılması, bir hastanedeki tedavi protokolünün belirlenmesi ve eğer bir salgın var ise acil ve uygun önlemlerin alınması açısından önemlidir.

Özet olarak, antibiyotiklere karşı çoklu dirençli olan bu patojenlerin göz ardı edilmeyip, yayılmalarının kontrol altına alınmalarında etkili stratejilerin belirlenmesi gerekmektedir.

6. ÖZET

6.1. AMAÇ

Bu çalışmada; Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde hastaların kan kültürlerinden izole edilen *A.baumannii* izolatlarından seftazidime dirençli suşlarda PCR yöntemi ile PER-1 tipi GSBL enzimatik genlerinin varlığının araştırılması ve PER-1 geni taşıyan *A.baumannii* izolatları arasında RAPD-PCR moleküler yöntemi ile hastane ortamındaki genotipik ilişki çıkartılarak hastane içerisindeki tür yakınlığının saptanması amaçlanmıştır.

6.2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşları alınmıştır. Bakteri identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve Phoenix 100 BD Otomatize Sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks) kullanılarak yapılmıştır. Seftazidim direnci E test yöntemi ile belirlenmiştir. Seftazidim dirençli suşlarda DNA izolasyonu için Qiagen DNA ekstraksiyon kiti (QIAGEN, United Kingdom) kullanılmıştır. PER-1 geninin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu, daha önceden tanımlanmış olan PER-1 gen bölgesine komplementlerini amplifiye eden PER1-F ve PER1-R primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jelde 100 V'da 1 saat yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanan jeldeki PER-1 genine ait bantlar UV ışık altında GelDoc sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. PER-1 pozitif *A. baumannii* suşlarının genetik olarak birbirlerine yakınlıkları Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile M13 primeri (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') kullanılarak yapılmıştır. Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde 100 V'da 1 saat ve 50 V'da 1 gece yürütüldükten sonra jeldeki bant görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bant büyüklükleri kullanılarak veriler kümeleme analiz yöntemi ile Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) programı kullanılarak dendogramı yapılmıştır.

6.3. BULGULAR

E test yöntemi ile 100 suşun 78'i (%78) seftazidime dirençli bulunmuştur. 78 adet seftazidim dirençli suşun PCR analizine göre 18 (%23)suşta PER-1 geni saptanmıştır. RAPD yöntemi ile 18 adet PER-1 pozitif suşun klonal ilişkisine bakılmıştır. Bantlar arasındaki benzerlikler "dice smilarity coefficients"e göre hesaplanmış ve PER-1 pozitif tüm suşlar birbiri ile ilişkili bulunmuştur.

6.4. SONUÇ

Çalışmamızda daha önce yayımlanan verilerden daha düşük oranda PER-1 pozitifliği saptanmıştır. Ancak çalışmamızdaki suşların çoğunun seftazidime dirençli olması, bu suşlarda farklı direnç genlerinin varlığını düşündürmektedir. PER-1 varlığı saptanan suşların RAPD analiz yöntemi ile klonal ilişkisini araştırdığımızda, farklı kliniklerde klonal ilişkili suşların saptanması, hastaların zaman zaman aynı servislerde yatmasına bağlı olabilir ve bu bulgular servisler arası yayılım olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, PER-1, RAPD, klonal ilişki

7. ABSTRACT

Detection of extended spectrum beta lactamase type PER-1 from the *Acinetobacter baumannii* species and investigation of clonal relationship by RAPD PCR

7.1. OBJECTIVE

In this study, the presence of PER-1 type ESBL was investigated in ceftazidime resistant *A.baumannii* strains isolated from bloodstream infections by PCR and also the clonal relatedness of the isolates was investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in all PER-1 producing *A.baumannii* strains.

7.2. MATERIALS and METHODS

A.baumannii strains isolated from bloodstream infections was included in this study. The isolates were identified as *A.baumannii* by conventional methods and Phoenix 100 BD automated System system (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks). Ceftazidime resistance was determined by E-test method. For DNA extraction from ceftazidime-resistant *A.baumannii*, Qiagen DNA extraction kit (QIAGEN, United Kingdom) was used. PER-1 genes were screened by PCR. For PCR; PER1-F and PER1-R primers were used. Genetic relatedness of PER producing *A.baumannii* is investigated with RAPD by using M13 primer (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'). PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (Bio-Rad). Gels were scanned and the images captured by a Gel-Doc-2000 Gel Documentantion System. Data analyses were performed using Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

7.3. RESULTS

Of the 100 *A.baumannii* isolates; 78 (78%) were determined as ceftazidime-resistant by E-test method. Among the 78 ceftazidime-resistant *A.baumannii isolates* the PER-1 gene was identified in 18 (23%) isolates. The clonal relatedness of the 18 PER-1 positive isolates were investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The similarity of the bands were calculated according to "dice smilarity coefficients" and all PER-1 positive isolates were found as clonally related.

7.4. CONCLUSION

In our study the prevalence of PER-1 was lower than the previous studies. But presence of the high ceftazidime resistance rates among these isolates may indicate the presence of other beta-lactamases. Detection of clonal related isolates with RAPD analysis among different services may be because of the treatment of these patients at the same services before and this may explain the spread of PER-1 positive strains.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, PER-1, RAPD, clonal relatedness

9. TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, meslek hayatıma katkılarından dolayı hocalarım Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, çalışmalarımda emeği geçen Sayın Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN'a, Nükleer Tıp rotasyonum sırasında yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Oktay SARI ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Güngör TAŞTEKİN'e, tezimi 07102019 nolu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, ayrıca çalışmamda kontrol amaçlı kullandığım PER-1 pozitif suşların temininde yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Haluk VAHABOĞLU'na, dendogram analizi konusunda katkılarından dolayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Barış OTLU'ya, uyum içinde çalışmalarını ile huzurlu bir iş ortamı sağlayan asistan arkadaşlarıma, her zaman hatırlayacağım tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatım boyunca hep yanımda olan anneme, babama ve yakınlarıma, sabırları ve anlayışları için desteği ile bana hep güç veren sevgili eşime ve can yoldaşım kızıma teşekkür ederim.

8. KAYNAKLAR

1. Koneman W.E, Procop W.G, Schreckenberger C.P, Woods L.G. Nonfermentative Gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins 2006:8th ed Chapter 7: 303-91.
2. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 106-19.
3. Bilgehan H. Neisseriaceae. In: Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 1994. 8. Basım: 247-98.
4. Parker M.T. *Chromobacterium, Flavobacterium, Acinetobacter* and *Alkaligenes*. In: Parker MT editor, Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity, London: Edward Arnold Ltd, 1983;7 chapter 32: 263-71.
5. Cisneros JM; Rodriguez-Bano, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment : Clin Microbiol Infect 2002; 8: 687-93.
6. Graevenitz A. *Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. In: Murray RP editor. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press 1995; 6th ed, Chapter 41: 520-532.
7. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-65.
8. Gerçekler D. Miscellaneous (çeşitli) Gram negatif bakteriler. In: Ustaçelebi Ş editor, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 15: 541-50.
9. Bilgehan H. Fermentasyon yapmayan Gram olumsuz bakteriler. Klinik Mikrobiyolojik Tanı 4. Baskı İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2004: 465-74.
10. Forbes BA, Sahm FD, Weissfeld SA. *Acinetobacter, Stenotrophomonas* and similar organisms. Diagnostic Microbiology, 12th ed, section 7; Chapter 23: 334-9.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas* and related organisms. Medical Microbiology, Philadelphia: Elsevier, 5th ed 2005; Chapter 34: 357-67.
12. Koneman W.E, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger C.P, Winn CW. The nonfermentative Gram negative bacilli. Introduction to Diagnostic Microbiology. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994; Chapter 3: 75-101.
13. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, I Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 1997; 35: 2819-25.
14. Thamlikitkul V, Santiprasitkul S, Suntanondra L, Pakaworawuth S, Tiangrim S, Udompunthurak S et al. Skin flora of patients in Thailand. Am J Infect Control 2003; 31: 80-4.
15. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1671-3.
16. Kaya O, Kırkan Ş, Ünal B. *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu hastane infeksiyonları. İnfeksiyon Derg 2000;14: 565-7.
17. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 33-41.
18. Van Looveren M, Goossens H, the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 684-704.
19. Mahgoub S, Ahmed J, Glatt EA,. Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. Am J Infect Control 2002; 30: 386-90.

20. Perez F, Hujer MA, Hujer MK, Decker KB, Rather PN, Bonomo AR. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3471-84.
21. Hartzell JD, Kim AS, Kortepeter MG, Moran KA. *Acinetobacter pneumonia: a review. MedGenMed.* 2007; 9: 4. Published online 2007 July 5.
22. Slama GT. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care* 2008; 12: S4.
23. Çakır-Edis E, Çağlar T, Oktun M, Gürcan Ş, Hatipoğlu NO, Erkan T. Hastane kökenli pnömonilerde sorumlu etkenler ve antimikrobiyal direnç değişimi. *İnfeksiyon Derg* 2006; 20: 107-10.
24. Sevinç C, Şahbaz S, Uysal Ü, Kılınç O, Ellidokuz H, İtil O ve ark. Hastane kökenli pnömoni olgularında etken dağılımı ve prognoza etkili faktörler. *Tüberküloz ve Toraks Derg* 2007; 55: 153-9.
25. Erdoğan H, Bal Ç. Yoğun bakım pnömonilerinin mikrobiyolojik izlemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 225-31.
26. Babay AH, Kambal MA, Al-Anazy RA, Saidu BA, Aziz S. *Acinetobacter* bloodstream infection in a teaching hospital - Riyadh, Saudi Arabia. *Kuwait Medical Journal* 2003; 35: 196-201.
27. Valero C, Garcia Palomo JD, Matorras P, Fernandez-Mazarrasa C, Gonzalez Fernandez C, Farinas MC. *Acinetobacter* bacteraemia in a teaching hospital, 1989–1998. *Eur J Intern Med* 2001; 12: 425-9.
28. Köksal F, Samastı M. Kan örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 32: 187-92.
29. Demirbakan H, Dağlar D, Yıldırım Ç, Öztürk F, Öngüt G, Yaman M ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35: 183-8.
30. Raveh D, Rudensky B, Schlesinger Y, Benenson S, Yinnon AM. Susceptibility trends in bacteremias: analyses of 7544 patient-unique bacteremic episodes spanning 11 years (1990-2000). *J Hosp Infect* 2003; 55: 196-203.
31. Güçlü ÜA, Kılıç A, Küçükaraaslan A, Baysallar M, Doğanç L. Beyin omurilik sıvılarından izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Gülhane Tıp Derg* 2005; 47: 204-8.
32. Saba R, İnan D, Günseren F, Özçelik FT, Mamıkoğlu L. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde nozokomiyal menenjitler. *Hastane İnfeksiyonları Derg* 2000; 4: 47-50.
33. Savaş L, Güvel S, Turunç T, Savaş N, Arslan H. Toplum kökenli ve nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu etkenleri ve antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması. *Türk Üroloji Derg* 2003; 29: 95-100.
34. Kibar F, Yaman A, Dünder H İ. İdrar örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 162-70.
35. Chim H, Tan HB, Song C. Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of *Acinetobacter baumannii* in a tropical climate. *Burns* 2007; 33: 1008-14.
36. Davis AK, Moran AK, McAllister KC, Gray JP. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1218-24.
37. Bachmeyer C, Landgraf N, Cordier F, Lemaitre P, Blum L. *Acinetobacter baumannii* folliculitis in a patient with AIDS. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 256-8.
38. Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T. *Acinetobacter* corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two case. *Can J Ophthalmol* 2005; 40: 79-82.

39. Akalın H. Kolistin. ANKEM Derg 2007; 21(Ek 2): 26-8.
40. Noskin GA. Tigecycline: A new glycylycline for treatment of serious infections. Clin Infect Dis 2005; 41: 303-14.
41. Stein GE, Craig WA. Tigecycline: A critical analysis. Clin Infect Dis 2006; 43: 518-24.
42. Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var! ANKEM Derg 2004; 18(Ek 2): 98-103.
43. Gür D. Beta-Laktamazlar. Hacettepe Tıp Derg 2002; 33: 102-9.
44. Hasman H, Çetin DB. Nozokomiyal infeksiyon etkeni mikroorganizmalarda antibakteriyel direnç. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005; 35: 67-73.
45. Dolapçı İ. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri. Mikrobiyol Bült 2005; 39: 229-40.
46. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. Review in Clin Microbiol Infect 2008; 14: 42-52.
47. Alekshun M. N, Levy S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 2007; 128: 1037-50.
48. Paterson L.D, Bonomo AR. Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 657-86.
49. Bonomo AR, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006; 43: 49-56.
50. Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. In: Durmaz R editor, Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2001; 15-34.
51. Oral HB ve ark. Polimeraz zincir reaksiyonu. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Derg 1992; 12: 49-57.
52. Molecular Diagnosis In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA editors: Medical Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby 2005; 17: 177-81.
53. Öztürk R. Hastane enfeksiyonları kontrolünde moleküler mikrobiyoloji metotlarının önemi. Ed: Durmaz R. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007: 64-75.
54. Bardakçı F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk J Biol 2001; 25: 185-96.
55. Atienzar AF , Jha NA. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutation Research 613 2006: 76-102.
56. Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. Ed: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2001; 149-60.
57. Podzorski PR. Gel electrophoresis, Southern hybridization and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. In: Persing HD editor. Molecular Microbiology, Washington: ASM Press, 2004; Chapter 22; 273-80.
58. Alp E, Esel D, Yıldız O, Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. Scand J Infect Dis 2006; 38: 335-40.
59. Otlu B, Durmaz R. Farklı bakteri ve mantar türlerinin alttıplendirilmesi için ortak bir "Arbitrarily Primed" polimeraz zincirleme reaksiyon protokolü. Ed: Durmaz R. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007: 208-13.
60. Öncül O. Hastane Kökenli Gram Negatif Çomaklarda Direnç. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 19-23 Eylül 2004; 94-7.

61. Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde direnç sorunu: Kocatepe Tıp Derg 2004; 5: 17-21.
62. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection?. Clin Infect Dis 2004; 39: 1182-9.
63. Aygün G, Dikmen Y, Mete B, Utku T, Murtezaoğlu A, Demirkıran O ve ark. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılığı. ANKEM Derg 2002; 16: 85-8.
64. Sunenshine HR, Wright OM, Maragakis LL, Haris DA, Song X, Hebden J et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. Emerg Infect Dis 2007; 13: 97-103.
65. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, Ko WC. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol 2007; 28: 713-9.
66. Ardiç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg 2004; 18: 145-8.
67. Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among Gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. Folia Microbiol 2007; 52: 535-41.
68. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg 2005; 19(Ek 2): 66-77.
69. Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, Nordmann P. Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 157-8.
70. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, ve ark. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a Nationwide Multicenter Study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2265-9.
71. Hujer MK, Hujer MA, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams MJ, Donskey JC, et al. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 4114-23.
72. Szabo D, Szentandrassy J, Juhasz Z, Katona K, Nagy K, Rokusz L. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008; 7: 12.
73. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004; 42: 2523-9.
74. Yong D, Shin JH, Kim S et al. High prevalence of PER-1 extended spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1749-51.
75. Jeong S.H, Bae I.K, Kwon S.B, Lee K, Yong D, Woo G.J et al. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum β -lactamase in an intensive care unit. J Hospital Infect 2005; 59: 242-8.
76. Vahaboglu H, Coskun F, Tansel O et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1 type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 2001; 50: 642-5.
77. Koeleman GMJ, van der Bijl WM, Stoof J, Vandenbroucke-Grauls MJEC, Paul H.M. Savelkoul HMP. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22: 284-8.

78. Mathai E, Kaufmann ME, Richard VS, John G, Brahmadathan KN. Typing of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired respiratory infections in a tertiary care centre in Southern India. *J Hosp Infect* 2001; 47: 159-62.
79. Wroblewska M. M, Dijkshoorn L, Marchel H, Van Den Barselaar M, Swoboda-Kopec E, Van Den Broek P. J et al. Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2004; 57: 300-7.
80. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, Crivaro V, Ragone E, Mattei A, Galdieri N, Triassi M, Utili R Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 481-9.
81. Wilks M, Wilson A, Warwick S, Price E, Kennedy D, Ely A et al. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 654-8.
82. Denton M, M'Zali FH, Wilcox MH, Parnell P, Porter C, Keer V et al. Outbreak of PER-1-like-producing *Acinetobacter baumannii* occurring on a neurosurgery intensive care unit. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 1999; 39: 169 (abstract no. 1486).
83. Longo B, Pantosti A, Luzzi I, Tarasi A, Di Sora F, Gallo S, et al. Molecular findings and antibiotic-resistance in an outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43: 83-8.
84. Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini MG, Q Toniolo A. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 52.
85. Akalın H, Özakın C, Gedikoğlu S, Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Turkey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 404-8.
86. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H and The Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 15: 241-5.
87. Aktaş Z, Poirel L, Şalcıoğlu M, Özcan P.E, Midilli K, Bal Ç, ve ark. PER-1 and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 193-8.
88. Güdücüoğlu H, Durmaz R, Yaman G, Cızmeçi Z, Berktaş M, Durmaz B. Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching Hospital in Turkey. *New Microbiologica* 2005; 28: 337-43.
89. Özgenç O. Hastane kökenli çoklu dirençli Gram negatif çomaklarda tedavi seçenekleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 19-23 Eylül 2004: 98-103.