

# Kan Kültürlerinden Soyutlanan *Acinetobacter baumannii* Suşlarında PER-1 Tipi Beta Laktamaz Varlığı ve Klonal Yakınlığının Araştırılması

## Detection of PER-1 Type Extended Spectrum Beta Lactamase in the *Acinetobacter baumannii* Species Isolated from Blood Cultures and Investigation of Clonal Relationship

Mediha COŞAR,<sup>a</sup>  
Emine İnci TUNCER,<sup>b</sup>  
Uğur ARSLAN,<sup>b</sup>  
Ahmet MANSUR,<sup>c</sup>  
Barış OTLU,<sup>d</sup>  
Hatice TÜRK DAĞI,<sup>b</sup>  
Duygu FINDIK,<sup>b</sup>  
Rıza DURMAZ<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiyoloji Laboratuvarı,  
Evliya Çelebi Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi, Kütahya  
<sup>b</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi,  
Konya

<sup>c</sup>Mikrobiyoloji Laboratuvarı,  
Malatya Yeşilyurt Hasan Çalık  
Devlet Hastanesi, Malatya  
<sup>d</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya  
<sup>e</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırıkkale

Geliş Tarihi/Received: 09.03.2012  
Kabul Tarihi/Accepted: 13.11.2012

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenen  
(BAP Proje No: 07102019) proje kapsamında  
gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, "19<sup>th</sup> European Congress of Clinical Mi-  
crobiology and Infectious Diseases" (16-19 Mayıs  
2009, Helsinki, Finlandiya) Kongresinde sözlü sunum  
olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Hatice TÜRK DAĞI  
Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Konya,  
TÜRKİYE/TURKEY  
haticeturkdagi@yahoo.com

doi: 10.5336/medsci.2012-29481

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

**ÖZET Amaç:** Bu çalışmada hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarında seftazidime dirençli suşlarda PER-1 tipi genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) geninin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile, PER-1 geni taşıyan *A. baumannii* izolatları arasındaki genotipik ilişki random amplifiye polimorfik DNA (RAPD) PZR ve pulse-field jel elektroforezi (PFGE) moleküler yöntemleri ile saptanmış ve bu suşlarda çeşitli antibiyotiklere direnç araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Toplam 100 adet *A. baumannii* suşunun identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve Phoenix 100BD Otomatize Sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks) kullanılarak yapılmıştır. İzolatların seftazidime direnci E test yöntemi ile belirlenmiş ve seftazidime dirençli suşlarda PZR yöntemi ile PER-1 geninin varlığı araştırılmıştır. PER-1 geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının genotipik ilişkisi, RAPD-PZR ve PFGE moleküler yöntemleri ile çalışılmış ve bantlar arasındaki benzerlikler "dice similarity coefficients"e göre hesaplanmıştır. Suşların kolistine duyarlılıkları E test yöntemi ile diğer antibiyotiklere duyarlılıkları ise Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. **Bulgular:** 100 *A. baumannii* suşunun 78'i seftazidime dirençli bulunmuştur. Bu suşların 18'inde (%23) PER-1 geni saptanmıştır. PER-1 pozitif tüm suşlar klonal olarak ilişkili bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarında amikasin %67, imipenem %71, tetrasikline ve trimetoprim/sülfametoksazole %83, siprofloksasine %85, sefepime %87, piperasilin-tazobaktam %99 ve seftriaksona %100 oranında direnç saptanmıştır. Kolistine ise direnç saptanmamıştır. **Sonuç:** Sonuç olarak, yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarında PER-1 pozitifliği oranı (%23) düşük olmasına karşılık, suşların çoğunun seftazidime dirençli olması, bu suşlarda farklı direnç genlerinin varlığını göstermektedir. PER-1 varlığı saptanan suşların RAPD ve PFGE yöntemleri ile klonal ilişkileri değerlendirildiğinde, farklı kliniklerde klonal ilişkili suşların saptanması, hastaların zaman zaman aynı servislere yatanlarına ve servisler arası yayılma bağlı olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*; beta-laktamaz PER-1

**ABSTRACT Objective:** In this study, the presence of PER-1 type extended spectrum beta lactamases (ESBL) was investigated in ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bloodstream infections by polymerase chain reaction (PCR), and the clonal relation of the isolates was investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR and pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in all PER-1 producing *A. baumannii* strains. **Material and Methods:** The isolates were identified as *A. baumannii* by conventional methods and Phoenix 100BD automated system (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks). Ceftazidime resistance was determined by E test method and PER-1 genes were screened by PCR in ceftazidime resistant strains. Genetic relation of PER producing *A. baumannii* was investigated with RAPD and PFGE, and the similarity of the bands were calculated according to "dice similarity coefficients". Colistin susceptibility test was studied by E-test, and other antibiotic susceptibility tests were performed by the Kirby-Bauer disk-diffusion method according to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute. **Results:** Of the 100 *A. baumannii* isolates; 78 were determined as ceftazidime-resistant. The PER-1 gene was identified in 18 (23%) isolates of these strains. The clonal relation of the 18 PER-1 positive isolates were investigated by RAPD and PFGE. All PER-1 positive isolates were found to be clonally related. The resistance rates of the *A. baumannii* strains were found as follows: 67% to amikacin, 71% to imipenem, 85% to ciprofloxacin, 83% to tetracycline, 83% to trimethoprim-sulfamethoxazole, 87% to ceftazidime, 99% to piperacillin-tazobactam and 100% ceftriaxone. Colistin resistance was not determined. **Conclusion:** In our study, the prevalence of PER-1 was lower than the previous studies. However, presence of the high ceftazidime resistance rates among these isolates may indicate the presence of other beta-lactamases. Detection of clonally-related isolates with RAPD and PFGE in different clinics may be due to treatment of these patients in the same clinic before, and this may explain the spread of PER-1 positive strains.

**Key Words:** *Acinetobacter baumannii*; beta-lactamase PER-1

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(2):389-95

**A** *Acinetobacter* türleri dış ortamda, toprakta, atık sular ve hastane florasında bulunabilen fırsatçı patojenlerdir. *Acinetobacter* taşıyıcılık oranı hastanede yatan hastalarda topluma göre daha yüksektir ve kolonizasyonun boyutu hastanede yatış süresine bağlı olarak artmaktadır. Hastanelerde cansız nesnelere *Acinetobacter* ile uzun süre (yaklaşık beş ay) kolonize olabilmektedir.<sup>1-4</sup>

Son yıllarda *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere, kinolonlara ve karbapenemlere direnci de kapsayan çoğul dirençli suşlar bildirilmiştir.<sup>1,4</sup> Karbapenem duyarlı ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Acinetobacter baumannii* izolatlarında 40'dan fazla direnç geni saptanmış ve bu suşların genetik değişkenliği gösterilmiştir. Bu özelliği bakteriyeye, antibiyotik baskısı devam ettiği sürece çeşitli direnç mekanizmalarından faydalanma yeteneği vermekte ve aynı izolatta birkaç direnç mekanizması bulunabilmektedir. *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda ampirik tedavi uygulamak zordur ve relapslar yaygındır.<sup>5</sup>

Genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktam ajanların 1980'li yıllardan itibaren tedavi amaçlı yaygın olarak kullanılmaları sonucunda, beta-laktamaz enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak yeni enzimler ortaya çıkmıştır. PER-1 enzimi ülkemizde nonfermentatif Gram negatif çomaklarda yaygın olan, TEM ve SHV grubuna bağlı olmayan, class A'da yer alan Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) türevlerinden biridir. Bir bakterinin bu enzimi taşıyor olması mortalite açısından belirleyici olarak saptanmıştır.<sup>6</sup> Bu bakterilere bağlı enfeksiyonlarda, tedaviden önce enfeksiyon kontrol programı önem taşımaktadır. Düzenli sürveyans çalışmaları yapılmalı ve elde edilen veriler ışığında kontrol politikaları geliştirilmelidir.

Moleküler yöntemler enfeksiyonların hızlı tanısında, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanmasında, antibiyotik direnci saptanmasında, enfeksiyonların izleminde ve hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi konusunda yeni açılımlar sağlamıştır.<sup>7</sup>

Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen seftazidime diren-

çli *A. baumannii* suşlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile PER-1 tipi GSBL enzim geninin varlığının araştırılması ve PER-1 geni taşıyan *A. baumannii* izolatları arasındaki genotipik ilişkinin random amplifiye polimorfik DNA (RAPD) PZR ve pulse-field jel elektroforezi (PFGE) moleküler yöntemleri ile saptanması ve antibiyotiklere direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarında 2007-2008 yıllarında hastane enfeksiyonu etkeni olarak kan kültürlerinden soyutlanan her hastaya ait bir izolat çalışmaya alındı. Bakteri identifikasyonu konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi, şeker fermantasyon testleri) ve Phoenix 100 BD Otomatize Sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks) kullanılarak yapıldı, kontrol suşu olarak standart *A. baumannii* RSSK 02026 kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerileri dikkate alınarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve kontrol suşu olarak standart *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Kolistin duyarlılığı ise E test yöntemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Minimum inhibituar konsantrasyon (MİK) değeri  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  ise duyarlı ve  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  ise dirençli olarak değerlendirildi.<sup>8</sup>

Seftazidime direnç E test yöntemi ile belirlendikten sonra, seftazidime dirençli suşlarda DNA izolasyonu Qiagen DNA ekstraksiyon kiti (QIAGEN, United Kingdom) ile yapıldı. PER-1 geninin varlığı PZR ile araştırıldı.<sup>9</sup> Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jelde 100V'da 1 saat yürütüldükten sonra, etidyum bromid ile boyanan jeldeki PER-1 genine ait bantlar ultraviyole (UV) ışık altında Gel-Doc sistemi yardımıyla görüntülendi. Pozitif kontrol olarak Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilen PER-1 pozitif *P. aeruginosa* suşu kullanıldı.

PER-1 pozitif *A. baumannii* suşlarının genetik olarak ilişkisi RAPD-PZR ve PFGE yöntemleri ile araştırıldı. RAPD-PZR çalışması için Da Silva ve

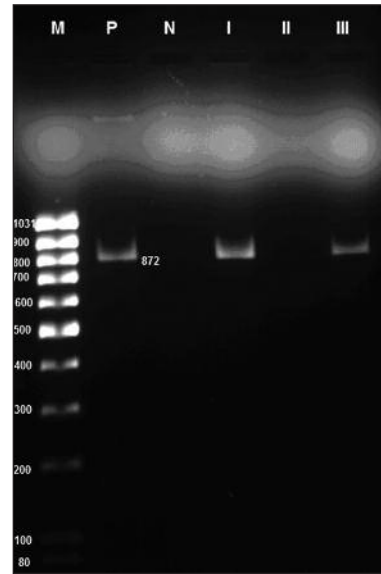
ark. tarafından uygulanan protokol kullanıldı.<sup>10</sup> Bu amaçla Qiagen Minikit (QIAGEN, United Kingdom) kullanılarak izole edilen ve hazırlanan amplifikasyon karışımı, GeneAmp 9700 PZR (Applied Biosystems, USA) cihazına yerleştirilerek uygun programda çoğaltıldı. Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz 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 aktarıldı. Bant büyüklükleri kullanılarak veriler kümeleme analiz yöntemi ile GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) programı kullanılarak dendogramı yapıldı ve bantlar arasındaki benzerlikler "dice similarity coefficients"e göre hesaplandı.

PFGE çalışması için izolasyon ve deproteinizasyon işlemleri Durmaz ve ark. tarafından hazırlanan hızlı protokol ile yapıldı.<sup>11</sup> Bakteri izolatları kanlı agara pasajlanarak 1 gece 37°C'de inkübe edildi, taze koloniler 1 mL hücre süspansiyon tamponu [100mM Tris-HCl, 100mM EDTA (pH:8.0)] içinde süspansiyonu yapıldı ve optik dansitesi spektrofotometrede (Boeco, Hamburg, Germany) 590 nm'de absorbansı 1 olacak şekilde ayarlandı. Bakteri ile hazırlanan DNA agar parçaları 30U Apal (Promega Corporation, WI, USA) ile kesildi. Parçalara ayrılan DNA %1'lik pulse-field için hazırlanan agaroz içinde CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) 14°C'de ve 6 V/cm<sup>2</sup>'de 20 saat yürütüldü. DNA bant profilleri GelCompar programı ile (versiyon 6.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) analiz edildi. Tenover kriterlerine göre suşlar arasındaki klonal yakınlık belirlendi.<sup>12</sup>

PER pozitif ve negatif suşların antibiyotik duyarlılık sonuçlarını karşılaştırmak için ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p<0,05 değeri kabul edildi.

## BULGULAR

Kan kültürlerinde üreyen toplam 100 *A. baumannii* suşu çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan toplam 100 *A. baumannii* suşununun 78 (%78)'i seftazidime dirençli, 7 (%7)'si orta duyarlı ve 15 (%15)'i duyarlı bulunmuştur. Seftazidime dirençli



ŞEKİL 1: PER-1 bantlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü.

M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, I ve II: PER-1 bandı pozitif örnek, II: negatif bir örnek.

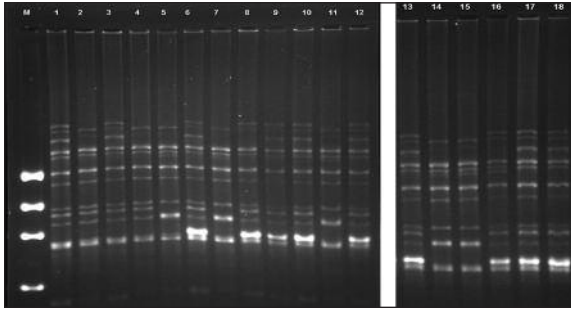
ve orta duyarlı olan toplam 85 suşta PER-1 pozitifliği araştırılmıştır. Orta duyarlı suşlarda PER-1 pozitifliğine rastlanmamıştır. Seftazidime dirençli 78 suşun 18 (%23)'inde PER-1 geni saptanmıştır (Şekil 1).

Hastaların servislere göre dağılımı ve PER-1 pozitif suşların izole edildiği hastaların yattığı klinikler Tablo 1'de gösterilmiştir. Beyin ve sinir cerrahisi, göğüs cerrahisi ve çocuk sağlığı ve hastalıkları servislerinde PER-1 enzimi saptanmamıştır.

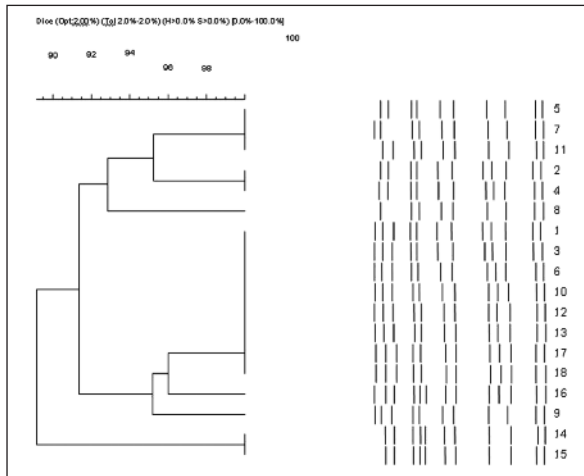
RAPD-PZR yöntemi ile PER-1 pozitif suşların birbiri ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 2). Ya-

TABLO 1: Soyutlanan *A. baumannii* ve PER-1 pozitif izolatların kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Hasta sayısı	PER-1 pozitif suş sayısı
Nöroloji	34	6
Göğüs Hastalıkları	19	4
İç Hastalıkları	16	1
Reanimasyon	10	3
Kalp Damar Cerrahisi	9	2
Acil Servis	6	1
Beyin ve Sinir Cerrahisi	3	-
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	2	-
Göğüs Cerrahisi	1	-
Toplam	100	18



**ŞEKİL 2:** RAPD-PZR yöntemi ile elde edilen bantların Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (Çalışmamızdan). M: marker, 1-18 PER-1 pozitif örnekler.

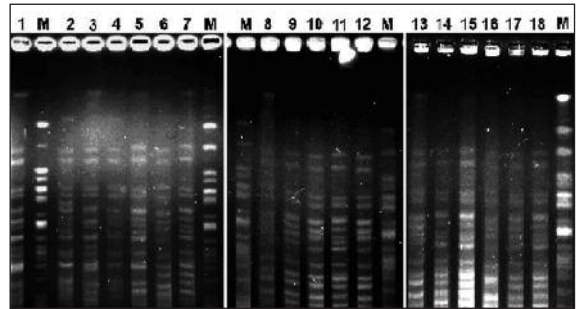


**ŞEKİL 3:** Random amplifiye polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile bakılan PER-1 pozitif suşların klonal ilişkisine ait dendrogram.

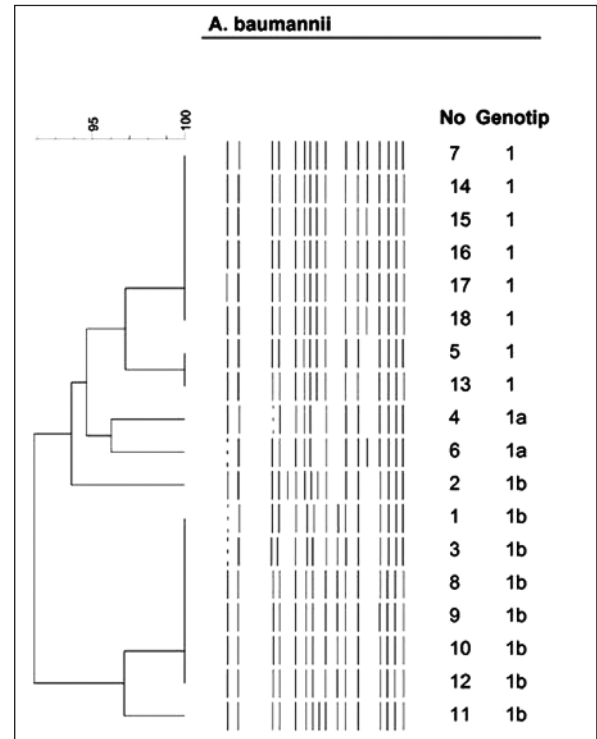
pılan dendrogram analizinde 5, 7, 11 numaralı suşların, 2 ile 4 numaralı suşların, 1, 3, 6, 10, 12, 13, 17, 18 numaralı suşların, 14 ile 15 numaralı suşların kendi aralarında %100 benzer olduğu görülmüştür (Şekil 3). Yapılan PFGE sonucunda 18 PER-1 pozitif suşun 8'nin tek PFGE profili (Pulsotip 1) oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4). Bunların dışında kalan izolatlar pulsotip 1 ile yakın ilişkili (2 adet 1a ve 8 adet 1b) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5). Suşlar arasındaki yüksek klonal ilişki PFGE ile de doğrulanmıştır.

*A. baumannii* suşlarında seftriaksone %100, piperasilin/tazobaktama %99, sefepime %87, siprofloksasine %85, trimetoprim-sulfametoksazole ve tetrasikline %83, imipeneme %71 ve amikasinine %67 oranında direnç saptanmıştır. Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde

sınırlı seçeneklerden biri olan kolistine direnç saptanmamıştır. PER pozitif ve negatif *A. baumannii* suşlarının amikasin direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sefepim, seftazidim, imipenem, siprofloksasin, tetrasiklin, trimetoprim/sulfametoksazol ve piperasilin/tazobaktam direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 2).



**ŞEKİL 4:** PER-1 pozitif *A.baumannii* izolatlarının pulse-field jel elektroforezi görüntüsü.



**ŞEKİL 5:** Pulse-field jel elektroforezi yöntemi ile PER-1 pozitif suşların klonal ilişkisine ait dendrogram.

**TABLO 2:** PER pozitif ve negatif *A. baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç sayısı ve oranları.

	PER Pozitif (18 suş)		PER Negatif (82 suş)		p
	n	(%)	n	(%)	
CIP	18	(100)	67	(81,7)	0,066
AK	17	(94,4)	50	(61,0)	0,006
SXT	14	(77,8)	69	(84,1)	0,501
TE	14	(77,8)	69	(84,1)	0,501
CRO	18	(100)	82	(100)	-
FEP	18	(100)	69	(84,1)	0,117
TZP	18	(100)	81	(98,8)	0,999
IPM	16	(88,9)	55	(67,1)	0,065
CAZ	18	(100)	68	(82,9)	0,068

CRO: Seftriakson; TZP: Piperasilin/tazobaktam; FEP: Sefepim; CIP: Siprofloksasin; SXT: Trimetoprim/Sulfametoksazol; TE: Tetrasiklin; IMP: İmipenem; AK: Amikasin.

## TARTIŞMA

Klinik öneme sahip olan Gram negatif bakteriler arasında, GSBL üreten kökenlerin artması ve oksii-mino  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere de direnç geliştirmeleri nedeni ile tedavi başarısızlıkları söz konusu olmaktadır. Bu enzimlerden biri olan PER-1, oksii-mino sefalosporinlere karşı aktivitesinin yüksek olması ve patojen bakteriler arasında yayılmasından dolayı klinik açıdan önemli bir enzimdir.<sup>13</sup> İlk olarak 1991 yılında Fransa'da bir Türk hastada izole edilen *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmış, daha sonraki çalışmalarda *Salmonella typhimurium*, *A. baumannii* gibi bakterilerde de saptanmıştır.<sup>14</sup> PER-1 geninin varlığı 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada ilk defa *Klebsiella pneumoniae* suşunda gösterilmiştir.<sup>15</sup>

Yong ve ark., Kore'de yaptıkları bir çalışmada, 97 *Acinetobacter* spp. suşunun 53'ünde (%54,6) PER-1 genini pozitif bulmuşlardır.<sup>16</sup> Aynı ülkede yapılan başka bir çalışmada 293 seftazidim dirençli *A. baumannii* suşunun %34'ünde PER-1 geni belirlenmiştir.<sup>17</sup> Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* suşlarında %31-60 gibi artan oranlarda PER-1 pozitifliği bildirilmiştir.<sup>9,14,18</sup> *P. aeruginosa* suşlarında yapılan bir çalışmada da %46 oranında PER-1 geni tespit edilmiştir.<sup>19</sup> Bizim çalışmamızda ise, yatan hastaların rutin kan kültürlerinde üreyen

78 adet seftazidim dirençli *A. baumannii* suşunun %23 (18 suş)'ünde PER-1 geni saptanmıştır. Ülkemizde elde edilen veriler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz orandan daha yüksektir. Bu da göstermektedir ki, PER-1 oranı antibiyotik kullanım politikalarındaki veya enfeksiyon kontrol programlarındaki muhtemel farklılıklara bağlı olarak, farklı merkezler arasında değişebilmektedir.

Hastane kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonlarının epidemiyolojisine yönelik farklı kaynaklardan izole edilen izolatlarla ve farklı metodların kullanıldığı değişik çalışmalar bulunmaktadır. Mathai ve ark. *A. baumannii* enfeksiyonlarının epidemiyolojisini saptamak için, hastane kaynaklı solunum sistemi enfeksiyonlarında izole edilen 27 izolatı, RAPD yöntemi ile tiplendirmişler ve hastanede farklı klonların bulunduğunu bildirmişlerdir.<sup>20</sup> Denton ve ark. İngiltere'de bir hastanenin nöroşirurji yoğun bakım ünitesinde, 10 hastada PER-1 pozitif *A. baumannii* salgını tanımlamışlar, hastalardan izole edilen suşlar ile servis ortamından izole edilen suşların %46'sının aynı olduğunu saptamışlardır.<sup>21</sup> Servisi kapatılarak ve tam bir temizlik protokolü uygulayarak salgını durdurulabilmişlerdir. Kore'de yapılan bir çalışmada PER-1 pozitif *Acinetobacter* suşlarında PFGE ile genotipik analizlerine göre 23 farklı patern saptanmıştır. Bunlardan çoğunun yoğun bakım ünitesi orijini olması, klonal yayılımın olabileceğini göstermiştir.<sup>16</sup> Alp ve ark. Erciyes Üniversitesi Hastanesi'nde nozokomiyal bakteriyemi etkeni olarak izole edilen *Acinetobacter* türlerinin RAPD-PZR ve PFGE ile genotipik analizini yapmışlar ve 41 *A. baumannii* suşunun %80 (32 hasta)'inin genotip 3'e ait olması ve bu 32 hastanın %75 (24 hasta)'inin yoğun bakımda bulunmasına dayanarak çapraz yayılım düşünülmüşlerdir.<sup>22</sup> Uludağ Üniversitesi Hastanesi'nde, 2000-2003 yılları arasında izole edilen 120 *A. baumannii* suşunu (klinik örneklerden 103, çevre kültürlerinden 10, yoğun bakım havasından 7 izolat) RAPD-PZR yöntemi ile incelemişlerdir. Genetik değişimi araştırmak için 3 periyotta çalışmışlar ve 12 farklı genotip saptamışlardır. Bu genotiplerin izole edildikleri servislere ve örneklerle göre değerlendirilmeleri sonucunda çevresel kontaminasyon, hava yolu ile yayılım, hasta transferi ve çapraz-



kontaminasyonun *A. baumannii*'nin neden olduğu epidemilerde önemli olduğunu vurgulamışlardır.<sup>23</sup> Vahaboğlu ve ark. Türkiye'de 8 farklı üniversite hastanesinden topladıkları *Acinetobacter* suşlarında %60 oranında PER-1 pozitifliği tespit etmişler, suşların klonal benzerliğine baktıklarında, iki farklı klon saptamışlar ve bu enzimin Türkiye'de oldukça yaygın olduğunu, farklı türler ve farklı klonlar arasında yayıldığını göstermişlerdir.<sup>18</sup> Çalışmamızda PER-1 varlığı saptanan suşların RAPD analiz yöntemi ile klonal ilişkisini araştırdığımızda, dendogram analizine göre birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar içinde 5, 7, 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. Epidemiyolojik çalışmalarda altın standart olarak kabul edilen PFGE ile bu suşların tek bir klondan kaynaklanan salgın suşu olduğu düşünülmüştür. Suşların klonal ilişkili olmaları, belli bir suşun klinikler arasında dolaştığını göstermektedir.

Çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* suşları ile enfekte olan hastaların hem yoğun bakım ünitesinde hem de hastanede kalış süreleri uzadığı ve bu suşlar ile enfekte hastalar arasında mortalite oranlarının yüksek olduğu gözlenmiştir.<sup>24</sup> Lee ve ark. yaptıkları çalışmada, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii*'ye bağlı bakteremi olgularında mortalite oranının daha yüksek olduğunu ve tıbbi harcamaların daha da arttığını vurgulamışlardır.<sup>25</sup> Özellikle PER-1 taşıyan suşlar ile gelişen nozokomiyal enfeksiyonların daha zor tedavi edildiği ve hastaların mortalitelerinin artırdığı belirlenmiştir.<sup>24,25</sup> Jeong ve ark. bir yoğun bakım ünitesinde, tek bir PER-1 pozitif *A. baumannii* klonu ile enfekte 10 hastadan oluşan bir salgını incelemişler ve PER-1 taşıyan suşlar birçok antibiyotiğe dirençli olduğu için, bu suşlara bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinin PER-1 taşımayanlardan daha zor olduğunu belirtmişlerdir.<sup>26</sup> Çalışmamızda PER-1 geni taşıyan suşların amikasine direnç oranı, taşımayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş fakat diğer antibiyotiklere direnç oranları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Nozokomiyal çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde

kolistin yeterli ve efektif olduğu bildirilmiştir.<sup>27</sup> Dizbay ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşlarında kolistin duyarlılığı %100 bulunmuştur.<sup>28</sup> Bizim çalışmamızda da kan kültürlerinde üreyen 100 *A. baumannii* suşunda kolistine direnç saptanmamıştır. *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda alternatif ajanlara direnç söz konusu olduğunda tedavi seçeneği olarak kolistin öne çıkmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de *Acinetobacter* türlerinin birçok ilaca artan direnci nedeniyle tedavide karbapenemler ilk seçenek olarak düşünülmektedir. Son zamanlarda *Acinetobacter* izolatlarında karbapenemaz üretimindeki artış, bu antibiyotiklere karşı direnci de beraberinde getirmiştir.<sup>29</sup> Yavuz ve ark. imipenem direnci %17 bulurken, Korten ve ark. ise %48 oranında saptamışlardır.<sup>30,31</sup> Ankara'da yapılan bir çalışmada karbapenem direnci 2007 yılında %32' iken, 2010 yılında %80'lere yükselmiştir.<sup>32</sup> Bizim çalışmamızda da oldukça yüksek bir oran (%71) elde edilmiştir. Antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı, antibiyotik dozunun iyi ayarlanmaması gibi nedenlere bağlı olarak direnç oranları artmakta ve tedaviler güçleşmektedir.

*A. baumannii* suşlarının birden fazla ilaca dirençli olmaları tedavide önemli sorunlar oluşturmaktadır. Dirençte artış, sağlık harcamalarını yükseltmekte, morbidite ve mortaliteyi arttırmakta ve yeni patojenlerin ortaya çıkışına neden olmaktadır. Bu nedenlerle tedavi sorunu yaratan bu tür enzimlerin 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. Sonuç olarak, antibiyotiklere karşı çoklu dirençli olan bu patojenlerin göz ardı edilmeyip, yayılmalarının kontrol altına alınmalarında etkili stratejilerin belirlenmesi gerekmektedir.

### **Teşekkür**

*PER-1 pozitif suşun teminindeki yardım ve destekleri için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Haluk Vahaboğlu'na teşekkür ederiz.*

## KAYNAKLAR

- Koneman WE, Procop WG, Schreckenberger CP, Woods LG. The nonfermentative gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p.303-91.
- Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 1997; 35(11):2819-25.
- Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007;29(Suppl 3):S33-41.
- Van Looveren M, Goossens H; ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004;10(8):684-704.
- Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit Care 2008; 12(Suppl 4):S4.
- Akova M. [Alarm: There are extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)] ANKEM Derg 2004;18(Suppl 2):98-103.
- Öztürk R. [The importance of molecular microbiology methods in control of hospital infection]. Durmaz R, editör. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı. Malatya: İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi; 2007. p. 64-75.
- Clinical Laboratory Standard Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI Document M100-S17. Wayne: CLSI, 2007.
- Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H; Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. FEMS Microbiol Lett 2005;249(2):241-5.
- Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A. Identification of widespread, closely related Acinetobacter baumannii isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. Clin Microbiol Infect 2007; 13(2):190-5.
- Durmaz R, Otlu B, Çalışkan A, Gürsoy C. [A rapid pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol developed for subtyping Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, and Klebsiella spp.]. ANKEM Derg 2007;21(2):113-7.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33(9):2233-9.
- Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, 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(6):2523-9.
- 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 (Praha) 2007;52(5):535-41.
- Bae IK, Jang SJ, Kim J, Jeong SH, Cho B, Lee K. Interspecies dissemination of the bla gene encoding PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(3):1305-7.
- Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter spp. in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(5):1749-51.
- Lee Y, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Lee K. Dissemination of ceftazidime-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 92 in Korea. J Appl Microbiol 2012;112(6):1207-11.
- Vahaboglu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. 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(10): 2265-9.
- Ünlü Söğüt M, Yıldırım T, Birinci A, Durupınar B. Determination of PER-1 and OXA-10-like  $\beta$ -Lactamases in ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates by molecular methods. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(5):1227-35.
- 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(2):159-62.
- 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. (abstract no. 1486). 39<sup>th</sup> Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. California: American Society for Microbiology; 1999. p.169.
- Alp E, Esel D, Yildiz 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(5):335-40.
- Akalin H, Ozakin C, Gedikoglu S. Epidemiology of Acinetobacter baumannii in a university hospital in Turkey. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27(4):404-8.
- Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, Harris AD, Song X, Hebden J, et al. Multidrug-resistant Acinetobacter infection mortality rate and length of hospitalization Emerg Infect Dis 2007;13(1):97-103.
- Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial Acinetobacter baumannii bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28(6):713-9.
- Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of Acinetobacter baumannii producing PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in an intensive care unit. J Hosp Infect 2005;59(3):242-8.
- Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, Akrouf M, Ketata W, Chelly H, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. Int J Antimicrob Agents 2006;28(4):366-9.
- Dizbay M, Altuncelik A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from ventilator-associated pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2008; 32(1):29-32.
- Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007;29(Suppl 3):S33-41.
- Yavuz TM, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D. [Antibiotic susceptibility of Acinetobacter baumannii strains isolated from various clinical samples]. ANKEM Derg 2006;20(2): 107-10.
- Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B; Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(4):453-7.
- Özdem B, Gürel FC, Çelikkilek N, Balıkcı H, Açıkgöz ZC. [Antibiotic resistance profiles of Acinetobacter species isolated from several clinical samples between 2007-2010]. Mikrobiyol Bul 2011;45(3):526-34.