

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Hastane Kökenli Gram-Negatif Bakterilerde PER-1
Enziminin Moleküler Epidemiyolojisi**

Bayrı Eraç

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hastane Kökenli Gram-Negatif Bakterilerde PER-1 Enziminin Moleküler Epidemiyolojisi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Bayrı Eraç

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Zeynep Gülay

Bu araştırma D.E.Ü. Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 03.KB.SAG.009 sayı ile desteklenmiştir

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalıŐmam sÜresince bana her tÜrlÜ desteği veren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜlay'a, yetiŐmemde ve doktora eğitimi almamda büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güner CoŐar'a, doktora eğitimim sÜresince benden desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu ve diğer tüm hocalarıma, yardımları ve her zaman hatırlayacağım sıcak dostlukları için çalışma arkadaşlarım ve personelimize, ayrıca desteği ve anlayıŐı için eŐim Yasemin Eraç'a teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Gram-Negatif Bakterilerin Klinik Önemi Ve Direnç Sorunu.....	6
2.2. Beta-Laktam Antibiyotikler Ve Bu Grup Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	9
2.2.1. PBP'lerde Oluşan Değişiklikler.....	12
2.2.2. İlacın Hücre İçine Girişinin Kısıtlanması ve Aktif Pompa Sistemleri.....	13
2.2.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi.....	13
2.3. Beta-Laktamazlar.....	14
2.3.1. A-Sınıfı Beta-laktamazlar.....	14
2.3.2. B Sınıfı Beta-laktamazlar.....	17
2.3.3. C Sınıfı Beta-laktamazlar.....	18
2.3.4. D Sınıfı Beta-laktamazlar.....	20
2.4. Beta-Laktamaz Genlerinin Yayılım Yolları.....	20
2.4.1. Transformasyon.....	20
2.4.2. Ekstra kromozomal, kendini eşleyebilen genetik yapılar olan plazmitlerin konjugasyonu..	21
2.4.3. Transdüksiyon.....	21
2.4.4. Plazmitler.....	21
2.4.5. Transpozonlar.....	22
2.4.6. İntegronlar.....	23
2.5. PER-1 Enzimi.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Suşlar.....	29
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	30
3.3. PER-1 Enziminin PZT Yöntemiyle Araştırılması.....	31
3.4. PER-1 Üreten İzolatların Klonal Yakınlıklarının Araştırılması.....	32
3.5. blaPER-1 PZT Ürünlerinin Restriksiyon Analizi.....	33
3.6. PER-1 Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması.....	34
3.7. GSBL-Pozitif ve/veya İmipenem ve Seftazidim Diskleri Arasında Sinerji Saptanan Non-Fermantatif Bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin PZT ile Araştırılması.....	35

3.8. PER-1 Enziminin Aktarılabirliğinin İncelenmesi.....	36
3.8.1. Konjugasyon Deneyleri.....	36
3.8.2. Plazmit İzolasyonu.....	37
3.8.3. Plazmitten Kurtarma.....	39
3.9. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığının ve Epidemiyolojik Değerinin PZT ile Araştırılması.....	40
3.10. PER-1 Enziminin Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisinin PZT ile Araştırılması.....	41
3.11. DNA Dizi Analizi.....	42
4 BULGULAR.....	44
4.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	44
4.2. PZT Yöntemiyle PER-1 Enziminin Saptanması.....	47
4.3. PZT ile <i>blaPER-1</i> Geni Taşıdığı Saptanan Suşların, Seftazidim MİK Değerleri.....	49
4.4. PER-1 Üreten İzolatların Klonal Yakınlıkları.....	50
4.5. <i>blaPER-1</i> PZT Ürünlerinin Restriksiyon Analizi.....	54
4.6. DNA Dizi Analizi.....	55
4.7. PER-1 Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması.....	56
4.8. GSBL-Pozitif ve/veya İmipenem ve Seftazidim Diskleri Arasında Sinerji Saptanan Non-Fermantatif Bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin Varlığı.....	58
4.9. PER-1 Enziminin Aktarılabirliği.....	60
4.9.1. Konjugasyon Deneyleri.....	60
4.9.2. Plazmit İzolasyonu.....	61
4.9.3. Plazmitten Kurtarma Deneyleri.....	61
4.10. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığı ve Epidemiyolojik Değeri.....	61
4.11. <i>blaPER-1</i> Geninin Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisi.....	68
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	83
7. KAYNAKLAR.....	86

TABLO LİSTESİ

Tablo-1. Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazların sınıflanması.....	15
Tablo-2. Çalışmaya alınan izolatların yıl ve türlere göre dağılımı.....	29
Tablo-3: PZT ve dizi analizi için kullanılan oligonükleotid dizileri.....	43
Tablo-4. Seftazidim dirençli <i>P. aeruginosa</i> ve <i>A. baumannii</i> suşlarının, yıllara göre çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları.....	46
Tablo-5. Seftazidim dirençli <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> suşlarında, yıllara göre çeşitli beta-laktam antibiyotiklere gözlenen direnç oranları.....	47
Tablo-6. Yıllara ve türlere göre PER-1 enzimi saptanan suşların dağılımı.....	48
Tablo-7. <i>bla_{PER-1}</i> saptanan ve saptanmayan <i>P. aeruginosa</i> ve <i>A. baumannii</i> suşlarının çeşitli β-laktam antibiyotiklere direnç oranları.....	49
Tablo-8. <i>bla_{PER-1}</i> saptanan suşların yıllara göre seftazidim MİK değerleri.....	50
Tablo-9. GSBL(+) ve/veya IPM-CAZ Arası Sinerji Görülen Non-fermantatif Suşların TEM, SHV ve PER Oranları.....	59
Tablo-10. GSBL(+) ve/veya IPM-CAZ Diskleri Arasında Sinerji Görülüp, <i>bla_{PER-1}</i> Saptanmayan Non-fermantatif Suşlarda TEM ve SHV Türevi Enzimlerin Oranları.....	60
Tablo-11. 98-2000 döneminde izole edilen <i>bla_{PER-1}</i> (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri.....	64
Tablo-12. 2001 yılında izole edilen <i>bla_{PER-1}</i> (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri.....	65
Tablo-13. 2002 yılında izole edilen <i>bla_{PER-1}</i> (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri.....	65
Tablo-14. 2003 yılında izole edilen <i>bla_{PER-1}</i> (+) <i>P. aeruginosa</i> suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri.....	66
Tablo-15. 2003 yılında izole edilen <i>bla_{PER-1}</i> (+) <i>A. baumannii</i> suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri.....	67
Tablo-16. <i>bla_{PER-1}</i> (+) <i>P. aeruginosa</i> suşlarında saptanan ERIC-PZT ve integron paternler	67
Tablo-17 <i>bla_{PER-1}</i> (+) <i>A. baumannii</i> suşlarında saptanan ERIC-PZT ve integron paternleri	68

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1. Başlıca beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapıları.....	11
Şekil-2: İntegronların genel yapısı.....	23
Şekil-3: A sınıfı beta-laktamazlar ile PER-1'in evrimsel yakınlığı.....	25
Şekil-4. GSBL paterni gösteren bir <i>P. aeruginosa</i> suşu.....	46
Şekil-5. PER-1A ve PER-1B primerleriyle yapılan PZT sonucu elde edilen ürünler.....	48
Şekil-6. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının ERIC-PZT sonuçları.....	51
Şekil-7. PER-1 üreten <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının dendogramı.....	52
Şekil-8. PER-1 üreten <i>A. baumannii</i> izolatlarının dendogramı.....	53
Şekil-9. <i>Pvu-II</i> ile 450, 230, 158 ve 85 bp'lik parçalara ayrılan PZT ürünleri.....	54
Şekil-10. Bir <i>P. aeruginosa</i> suşunun dizi analizi yapılan bölgesine ait protein dizisinin, "Clustal W (1.83)" programı yardımıyla PER-1 ve PER-2 ile karşılaştırılması.....	56
Şekil-11. İzoelektrik noktaları bilinen, PER-1, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen bazı izolatların İEO jeli görüntüsü.....	57
Şekil-12. Özgül primerlerle TEM grubu enzim geni saptanan bazı <i>P. aeruginosa</i> suşları...	58
Şekil-13. Bazı <i>P. aeruginosa</i> suşlarının integron-PCR paternleri.....	62
Şekil-14. Bazı <i>A. baumannii</i> suşlarının integron-PCR paternleri.....	63
Şekil-15. Sınıf-1 integronların korunmuş bölgesi ve <i>blaPER-1</i> 'e özgü primerlerin kombin edilmesiyle üç <i>P. aeruginosa</i> suşunda elde edilen PZT ürünleri.....	69
Şekil-16. 2300 bp'lik ürünlerin kalıp olarak kullanıldığı standart PER-PZT sonuçları.....	69

KISALTMALAR

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

PBP: Penisilin Bağlayan Proteinler

6-APA: 6-Amino Penisilanik Asit

7-ASA: 7-Amino Sefalosporonik Asit

OMP: “Outer Membrane Protein”

MDR: “Multiple Drug Resistance”

MFP: Membran Füzyon Proteini

IS: İnsersiyon Sekansları

pI: İzoelektrik Nokta

ORF: “Open Reading Frame”

İEO: İzo-Elektrik Odaklama

NCCLS: “National Commmittee for Clinical Laboratory Standards”

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

TBE: Tris-Borik asit-EDTA

TEMED: N,N,N,N, tetra metil etilendiamin

ERIC: “Enterobacterial Repetitive İntergenic Consensus”

EB: Etidyum Bromür

CTX: Sefotaksim

FEP: Sefepim

ATM: Aztreonam

IPM: İmipenem

PRL: Piperasilin

AMC: Amoksisilin-klavulanik asit

PFGE: “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

Ala, A: Alanin

Arg, R: Arjinin

Asn, N: Asparajin

Asp, D: Aspartik asit

Gly, G: Glisin

Lys, K: Lizin

Ser, S: Serin

Thr, T: Treonin

ÖZET

Hastane Kökenli Gram-Negatif Bakterilerde PER-1 Enziminin Moleküler Epidemiyolojisi

Amaç: Yaklaşık beş yıllık bir dönemde Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde izole edilen seftazidime dirençli Gram-negatif bakterilerde, *bla_{PER-1}*'in görülme sıklığını ortaya koymak ve bu genin genetik yerleşimini araştırmak hedeflenmiştir.

Yöntem: 1998-2003 yılları arasında izole edilen 289 adet seftazidime dirençli Gram-negatif bakteride *bla_{PER-1}* varlığı PZT ile araştırıldı. PER-1 üreten bakterilerin klonal yakınlıkları ERIC-PZT yöntemiyle belirlendi. *bla_{PER-1}*'in genetik yerleşimini anlamak için, konjugasyon, plazmitten kurtarma deneyi ve integron-PZT gerçekleştirildi. Her ERIC-PZT paternine ait örnek suşlarda, *bla_{PER-1}* ve sınıf-1 integronların korunmuş bölgelerine özgü primerler kombine edilerek gerçekleştirilen PZT ile *bla_{PER-1}* geninin integronla ilişkisi araştırıldı. Elde edilen PZT ürünlerinin, doğrudan iki yönlü olarak DNA dizi analizi yapıldı.

Bulgular ve Sonuç: İncelenen suşlarda PER-1 üretim oranları, 98-2000 dönemi, 2001, 2002 ve 2003 yılları için sırasıyla, % 32.3, % 33.9, %14.9 ve %37.9 olarak saptandı. *P. aeruginosa* suşlarının % 46.2'sinde ve *A. baumannii* suşlarının % 35.9'unda *bla_{PER-1}* varlığı belirlenirken bir *A. faecalis* izolatında da *bla_{PER-1}* saptandı. ERIC-PZT sonuçları, *P. aeruginosa* (X ve Y) ve *A. baumannii* (A ve B) izolatları arasında belirlenen iki ana klonun, saptanan yüksek prevalanstan sorumlu olduğunu ortaya koydu. Farklı ERIC-PZT paternlerini temsil eden suşlarda gerçekleştirilen konjugasyon ve plazmitten kurtarma deneyleri, *bla_{PER-1}*'in kromozomal kaynaklı olduğuna işaret ediyordu. Bir *P. aeruginosa* izolatında, sınıf-1 integron ve *bla_{PER-1}*'e özgü primerlerin kombinasyonu ile gerçekleştirilen PZT sonucunda ürün elde edilmesi ve sonrasında yapılan doğrulama çalışmaları, bu izolatta *bla_{PER-1}* geninin bir sınıf-1 integronla ilişkili olduğunu gösterdi. Hastanemizde izole edilen seftazidim-dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında PER-1 enziminin yaygın olduğu, bu enzimi üreten birçok suşun "klonal ilişkili" oluşunun horizontal yayılıma işaret ettiği, *bla_{PER-1}*'in ilk defa sınıf-1 integronlarla ilişkili olduğunun gösterilmesinin, bu genin yayılımını hızlandırabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Gram-negatif, PER-1, epidemiyoloji, sınıf-1 integron

SUMMARY

Molecular Epidemiology of PER-1 Enzyme in Nosocomial Gram-negative Bacteria

Objectives: To investigate the prevalence of PER-1 beta-lactamase over a five-year period among ceftazidime resistant Gram-negative bacteria isolated at Dokuz Eylul University Hospital and to analyse the genetic location of *bla_{PER-1}*

Methods: *bla_{PER-1}* presence was sought by PCR in 289 ceftazidime resistant Gram-negative bacteria isolated between 1998 and 2003. Clonal relationship of PER-1 producers was determined by ERIC-PCR. Genetic location of *bla_{PER-1}* was investigated by conjugation, plasmid-curing experiments and integron-PCR. Integron-location of *bla_{PER-1}* was analysed by PCR combining primers specific for conserved region of class-1 integrons and *bla_{PER-1}*, in representatives of each ERIC-PCR pattern. Direct sequencing of PCR-products was performed on both strands.

Results and Conclusion: PER-1 production rates were 32.3 %, 33.9 %, 14.9 % and 37.9 % in 98-2000 period, 2001, 2002 and 2003, respectively. *bla_{PER-1}* was detected 46.2 % and 35.9 % of ceftazidime resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolates, respectively. An *A. faecalis* strain was also found to possess *bla_{PER-1}*. ERIC-PCR results revealed dissemination of two endemic clones for both *P. aeruginosa* (X and Y) and *A. baumannii* (A and B) was responsible for the high prevalence. Results of the conjugation tests and plasmid curing experiments suggested that *bla_{PER-1}* was located on the chromosome in the representative strains. PCR product obtained by combining class-1 integron and *bla_{PER-1}* specific primers in an *P. aeruginosa* isolate and confirmatory tests, indicated that *bla_{PER-1}* was integron associated. We concluded that; the prevalence of PER-1-production among ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolates is high in our hospital and PER-1 producers are being transmitted horizontally as most of the isolates are clonally related. It is also shown that, *bla_{PER-1}* was associated with class-1 integron in a clinical isolate for the first time, and this could facilitate dissemination of *bla_{PER-1}* among bacteria.

Key Words: Gram-negative, PER-1, epidemiology, class-1 integron

1. GİRİŞ VE AMAC

Gram-negatif bakteriler, hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Avrupa'da gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde infeksiyona neden olan mikroorganizmaların % 57'lik bir bölümünü Gram-negatif bakterilerin oluşturduğu ortaya konmuştur (1). Bu mikroorganizmalar, hastane kaynaklı pnömonilerin % 67,1'inden, üriner sistem infeksiyonlarının % 47'sinden, ve kateter infeksiyonlarının da % 19,5'inden sorumlu olup; sepsis, intraabdominal infeksiyonlar, cerrahi yara infeksiyonları ve endokarditlerin de önemli bir nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Hastane infeksiyonlarından sıklıkla izole edilmelerinin yanı sıra, klinik kullanımdaki birçok antibiyotik ajana dirençli olmaları önemlerini arttırmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, hastane ortamında en sık karşılaşılan Gram-negatif bakterilerin *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* ve *Acinetobacter spp.* olduğu belirlenmiştir (1).

Pseudomonas aeruginosa, hastane ortamında sık görülen ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olması, birden fazla antibiyotik grubuna farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmesi nedeniyle önemli bir bakteridir. *Acinetobacter* türleri ile birlikte hastane ortamında gelişen mortalitesi yüksek alt solunum yolu infeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biridir (2). *P. aeruginosa* suşlarında dış membran geçirgenliğinin az oluşu, aktif pompa sistemlerinin varlığı ve yapısal olarak sentezlenen C grubu beta-laktamazlar, bakterinin birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasını sağlamaktadır (3). *P. aeruginosa*'da kazanılmış direnç mekanizmaları da önemli rol oynar. Plazmit, transpozon ve integron gibi hareketli genetik elemanlar yolu ile sınıf A, B veya D tipi beta-laktamaz genlerini edinebilirler.

Acinetobacter türleri, çeşitli ortamlarda canlılıklarını koruyabilmeleri ve antibiyotiklere kolayca direnç geliştirebilmeleri nedeniyle, son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak önem kazanmışlardır (4). Alt solunum yolu ve cerrahi yara infeksiyonlarında sıklıkla sekonder bakteriyemi etkeni olabilen bu bakteriler,

karşılaştıkları antibiyotiklere kısa sürede dirençli hale gelebilir ve ciddi infeksiyon tabloları oluşturabilirler.

Enterik bakteriler de hastane infeksiyonlarına neden olmaları ve çeşitli antibiyotik gruplarına direnç geliştirmeleri nedeniyle artan bir öneme sahiptir (3). Özellikle yoğun bakım ünitesi ve hematoloji-onkoloji servislerinde yatan hastalar ile neonatal yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olabilirler. Başta *Klebsiella spp.* ve *E. coli* olmak üzere enterik bakterilerin üçüncü kuşak sefalosporinler ile monobaktamlar gibi sık kullanılan ajanlara direnç gelişimini sağlayan, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) sentezlemeleri yol açtıkları infeksiyonların tedavisini daha da zorlaştırmaktadır (5).

Beta-laktam antibiyotikler, gerek toplum gerekse hastane kaynaklı infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir. Hastane infeksiyonlarının tedavisinde çoğunlukla aminoglikozit veya kinolon grubu antibiyotikler ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Değişik ülke ve merkezlerde yapılan çalışmalar, yaygın kullanımlarına paralel olarak, beta-laktam antibiyotiklere direncin artmakta olduğunu ve bunun dünya çapında bir sorun haline geldiğini göstermektedir. Özellikle Gram-negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere önde gelen direnç mekanizması, beta-laktamaz üretimidir. Klinikte sık kullanılan geniş spektrumlu beta-laktamlara dirence yol açması nedeniyle GSBL'ler, en önemli beta-laktamaz gruplarından biridir. GSBL'ler üçüncü kuşak sefalosporinlerin, tedavi protokollerine girmesinin bir sonucu olup, klinik kullanımlarına göre GSBL prevalansı ve hakim GSBL tipi ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında değişmektedir. Hastanemizde 05.2002 – 04.2004 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların incelendiği bir çalışmada, *E. coli* suşlarında ilk yıl GSBL oranı % 12 iken ikinci yıl % 23' e ulaştığı saptanmıştır (6). Aynı tarihler arasında hastane kökenli idrar yolu infeksiyonu etkeni *E. coli*'lerde GSBL oranının % 17 artış gösterdiği belirlenmiştir (7).

GSBL'lerin çoğu TEM veya SHV türevi enzimlerdir. Ancak son yıllarda, bazı bölgelerde TEM ve SHV dışı GSBL'lerin ortaya çıktığı gözlenmektedir. İlk olarak bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda tanımlanan PER-1 enzimi, bu tür enzimlere bir örnektir. Bu enzim, TEM ve SHV türevi GSBL'ler ile yalnızca % 27'lik bir benzerlik göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda PER-1'in *P. aeruginosa*'nın yanı sıra *Acinetobacter spp.* ve *Salmonella typhimurium* gibi farklı Gram-negatif bakterilerde de bulunduğu belirlenmiştir. İki bin yılından itibaren Türkiye dışındaki ülkelerden de bu enzimi taşıyan suşlar bildirilmiştir.

PER-1, TEM ve SHV türevi enzimlerden farklı olarak, özellikle nozokomiyal infeksiyonlarda sık rastlanan Gram-negatif non-fermantatif bakterilerde bulunmakta ve penisilin, tikarsilin, seftazidim gibi anti-psödomonal ajanlara dirence yol açmaktadır. Hastanemizde 01.1999 – 09.2002 tarihleri arasında izole edilmiş, seftazidim dirençli 155 Gram-negatif bakteri ile yapılan ön çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının % 28,5'i ve *Acineobacter* suşlarının % 38,5'inin PER-1 geni taşıdığı saptanmıştır (8).

Amaç

Hastanemizde, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakteri türlerindeki PER-1 üretimi sıklığını, enzim prevalansının yıllara, türe ve servislere göre değişimini ve PER-1 üreten izolatların klonal yakınlıklarını araştırarak, bu enzimin hastanemizdeki epidemiyolojik özelliklerini ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gram-Negatif Bakterilerin Klinik Önemi Ve Direnç Sorunu

Gram-negatif bakteri türleri, gerek hastane gerekse toplum kökenli infeksiyonların önde gelen etkenlerindedir. Hücre duvarındaki dış membran yapısı nedeniyle, antibiyotiklere Gram-pozitif bakterilerden daha dirençli olan bu mikroorganizmalar, genetik madde aktarımı ve/veya antibiyotiklerin seçici baskısı ile çoklu direnç özelliği kazanmışlardır (9). Bazı Gram-negatif bakteriler yapıları nedeniyle çeşitli antibiyotiklere doğal olarak dirençlidirler. Ancak Gram-negatif bakterilerde kazanılmış direnç mekanizmaları da önemli rol oynar. Bu bakteriler, dış membran porin proteinlerindeki değişim ve/veya aktif pompa sistemleri nedeniyle antibiyotiğin hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi, antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretimi veya antibiyotiğin hedefi olan yapıdaki değişimler nedeniyle tedavide kullanılan antimikrobiyallere direnç kazanmaktadırlar.

Çoğu normal flora üyesi de olan ve hastane ortamında kolayca çoğalabilen Gram-negatif bakteriler, hastane infeksiyonlarının önde gelen etkenleri arasındadır. Ülkemizde hastane infeksiyonlarını inceleyen, 15 merkezden elde edilmiş verileri içeren bir çalışmaya göre; hastane infeksiyonlarının % 30-72'sinin etkeni Gram-negatif bakterilerdir (10). Ülkemizde yapılan araştırmalarda, *P. aeruginosa* (% 4-26), *Acinetobacter spp.* (% 20-66), ve *Klebsiella spp.* (% 7-21), *Staphylococcus aureus* ile birlikte en sık saptanan hastane kaynaklı pnömoni etkenleri arasında sayılmaktadır (2). Antibakteriyel direnç açısından en önemli bakteriler arasında, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* gibi non-fermantatif bakteriler ile *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* ve *Serratia spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyeleri sayılabilir.

Enterobacteriaceae üyeleri, klinik olarak anlamlı tüm izolatların yarısını, Gram-negatif izolatların ise % 80'ni oluştururlar (11). Bazı türler, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda da enfeksiyona neden olduklarından “fırsatçı” olarak da tanımlanırlar. Neden oldukları enfeksiyonların yayılımında sağlık personeli, parenteral tedavi ve kullanılan tıbbi aletler rol oynamaktadır (11). *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* türleri, *Serratia* türleri, *Citrobacter freundii*, *Proteus* türleri ve *Morganella morganii*, hastane kaynaklı olan enfeksiyonların % 30-40'ından sorumludur (3). Bu mikroorganizmalar, üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni, cerrahi yara enfeksiyonu ve sepsise yol açabilir. *K. pneumoniae*, başlıca antibiyotiklere direnç yolu açan çeşitli plazmit kaynaklı genler için genellikle bir rezervuar işlevi görür (3). *E. coli* suşları da diğer patojenlerden gen transfer edebilirler ve taşıdıkları virulans genlerine bağlı olarak birbirinden farklı hastalık tabloları yaratabilirler (12).

P. aeruginosa, konak savunmasının bozulduğu durumlarda invaziv hastalıklara neden olan, toksijenik özelliklere sahip fırsatçı bir patojendir. Hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Normal bağırsak ve cilt florasında az miktarda bulunmaktadır. Sıklıkla nozokomiyal pnömoni, sepsis ve yanık-yara enfeksiyonları gibi geniş bir spektrumda şiddetli enfeksiyonlara yol açar. Tedavi sırasında yaklaşık % 10 oranında direnç gelişim riski vardır. Bu yüzden *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu önemli enfeksiyonlarda, tek ilaçla tedavi yerine kombine ilaç tedavisi uygulanmalıdır. Tikarsilin, mezlosilin ya da piperasilin gibi penisilin grubu bir antibiyotik ile gentamisin, tobramisin veya amikasin gibi bir aminoglikozit birlikte kullanılabilir. Azteronam, karbapenemler, yeni kinolonlar, seftazidim ve sefoperazon gibi sefalosporinler *P. aeruginosa*'ya karşı etkilidir. Antibiyotik duyarlılıkları coğrafi bölgeler ve hastaneler arasında farklılık gösterebileceğinden, yapılacak duyarlılık testlerine göre tedaviye yön verilmelidir (11). *P. aeruginosa*'nın beta-laktam ajanlara direncinden; porin modifikasyonu, multiprotein aktif pompa sistemlerinin derepresyonu, C sınıfı kromozomal sefalosporinazların aşırı üretimi ya da plazmit kaynaklı A, B ve D sınıfı beta-laktamazlar sorumludur. Bu bakteride beta-laktam direnci çoğunlukla amikasin, siprofloksasin ve imipenem direnci ile birlikte ortaya çıktığından tedavide önemli sorunlara yol açar. *P. aeruginosa*'ya karşı uygulanan antibiyotik tedavisinde bazı noktalara dikkat edilmelidir (3):

- Yerel direnç srveyans verileri ve direnç fenotipleri,
- İnfeksiyon kaynağı,
- Altta yatan majör risk faktörlerinin varlığı (ntropeni ve mekanik ventilasyon),
- Hastanede yatış ve mekanik ventilasyon kullanım süresi,
- Hastanın önceden kullandığı antibiyotikler,
- Tedavi sırasında ortaya çıkabilecek direnci nleme ve en yüksek etkinliğe ulaşmak için gerekli farmakokinetik ve farmakodinamik parametreler,
- Antipsödomonal antibiyotik kombinasyonlarının in vitro olarak sinerjistik etkilerinin araştırılması,
- Antipsödomonal beta-laktam ve aminoglikozit kombinasyon terapisine karşın diğer antipsödomonal monoterapinin in vivo sonuçları dikkate alınması

Acinetobacter türleri doğada ve hastane ortamında yaygın olarak bulunmaktadır. İnsanlarda normal flora etkeni olarak sayılmamakla birlikte, hastane ortamında yaygın olarak bulunmaları cilt ve solunum sistemini sıklıkla kolonize etmelerine neden olmaktadır. *Acinetobacter* türleri arasında *A. baumannii* en sık izole edilen ve antibiyotiklere daha dirençli olan türdür. *A. iwoffi*, *A. johnsonii* ve *A. haemolyticus* daha az izole edilir. Fırsatçı patojen ve hastane infeksiyonu etkenidirler. Birçok antibiyotik ajana doğal dirençli olmaları, neden oldukları infeksiyonların tedavisinde problemlere yol açmaktadır. *A. baumannii*, yoğun bakım ünitelerinde pnömoni, sepsis, üriner sistem infeksiyonu, yara infeksiyonu ve menenjit gibi farklı infeksiyonlardan, son yıllarda gittikçe artan oranlarda sorumlu tutulmaktadır. *Acinetobacter* türleri, özellikle yaşam destek ünitelerinden faydalanan ve antimikrobiyal terapi alan hastalarda önemli bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarında beta-laktam direncinden sorumlu başlıca mekanizma, kromozom ya da plazmit kaynaklı beta-laktamazların yapımıdır. Ayrıca, penisilin bağlayan proteinler (PBP)'deki değişimlerin yanısıra bu suşlarda genellikle dış membran permeabilitesinin düşük oluşu da dirençte rol oynar. *Acinetobacter* türlerinin çoğu karbapenemlere duyarlıdır. Bununla birlikte, yoğun bakım ünitelerinde çoklu antibiyotik dirençli suşların yol açtığı salgınlarda karbapenem direnci de bildirilmiştir (3) .

Ülkemizde hastane kökenli Gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotik gruplarına duyarlılıklarını inceleyen çok merkezli çalışmalarda (Mystic-2003, Hitit-2004), üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ile florokinolonlara direncin önemli boyutlara ulaştığı, *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı karbapenemlerin hala etkinliklerini korumalarına karşın, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarında – izole edildikleri hastane servislerine göre değişmekle birlikte – bu antibiyotiğe direnç oranının % 40'a ulaştığı gözlenmektedir (9). Dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların sağaltımında çoğunlukla geniş spektrumlu, antipsödomonal özellikte beta-laktam ajanlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar tek başlarına veya kombine edilerek kullanılmaktadır. Beta-laktam ajanlar uygulanan tedavi rejimlerinin vazgeçilmez elemanlarıdır. Bu yaygın kullanımlarına paralel olarak direnç gelişimi de sıklıkla artmaktadır.

2.2. Beta-Laktam Antibiyotikler Ve Bu Grup Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

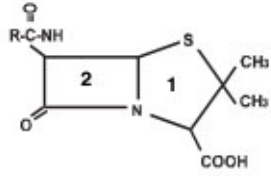
İlk bulunan antibiyotik grubu olan beta-laktamlar, günümüzde birçok mikroorganizmaya bağlı olarak gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılarına çeşitli kimyasal grupların eklenmesiyle etki spektrumlarının genişlemesi, diğer antibiyotik gruplarına oranla yan etkilerinin az oluşu gibi nedenler bu antibiyotiklerin tedavide ön plana çıkarmıştır.

Bakteri hücrelerine şeklini veren ve fonksiyonel bir stabilite sağlayan peptidoglikan tabaka; N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit amino-şekerlerden oluşan bir omurga, N-asetilmuramik asite bağlı tetrapeptid yan zincirler ve çapraz peptid köprülerinden oluşur. Omurga yapısı bütün bakterilerde aynı olmakla birlikte, tetrapeptid yan zincirler ve çapraz peptid köprüleri türden türe farklılık gösterebilir (13). Peptidoglikan biyosentezi birçok basamaktan oluşur ve sitoplazmada başlayıp hücre membranının dışında sonlanır. Biyosentezin son aşaması transpeptidasyondur. Bu aşamada, pentaglisin yan zincirinin üzerindeki terminal glisin yapısı, bitişik zincirdeki D-alanin'e, bir diğer D-alanin molekülünü açığa çıkararak bağlanır. Bu reaksiyonu

katalize eden transpeptidazlar, hücre membranına yapışık durumdadır ve “Penisilin Bağlayan Proteinler” (PBP) adı verilen bir enzim ailesinin üyesidirler. Transpeptidazların haricinde diğer PBP’ler de bakteri hücre duvarı sentezinde görev alır. PBP’ler, en yüksek molekül ağırlığı olan “1” numara olacak şekilde numaralandırılırlar (14).

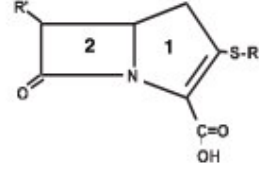
Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması “moleküler benzerlik” temeline dayanır. Penisilin ve sefalosporinlerin moleküler yapısı, peptidoglikan zincirindeki pentapeptidlerin terminalinde yer alan D-alanil D-alanin’e yapısal benzerlik gösterir. Bu nedenle, PBP’ler beta-laktam ajanlarla etkileşip, onları peptidoglikan zincirine eklemeye çalışırlar. Sonuçta peptidoglikan zincirinin sentezi durur ve otolizinin devreye girmesiyle hücre ölümü gerçekleşir (15). Çeşitli beta-laktam ajanların her bir PBP’e olan afiniteleri farklıdır. Birden çok PBP’e bağlanma bakterisidal aktiviteye katkıda bulunur (14). Tüm beta-laktam antibiyotiklerde, dört üyeli ortak bir beta-laktam halkası bulunur. Monobaktamlar hariç bu halkaya ikinci bir halka eklenmiş durumdadır (şekil-1). Penisilin ve benzerlerinde bu iki halkalı yapıya 6-amino penisilanic asit (6-APA), sefalosporinlerde ise 7-amino sefalosporonik asit (7-ASA) adı verilir. Kimyasal yapılarına göre beta-laktam ajanlar üç ana grup altında toplanabilir (15):

1. Beta-laktam halkası ve beş üyeli yan zincir içerenler:
 - Penam: Penisilinler, sulbaktam, tazobaktam
 - Klavam: Klavulanik asit
 - Karbapenem: İmipenem, meropenem, tienamisin
2. Beta-laktam halkası ve altı üyeli yan zincir içerenler:
 - Sefem: Sefalosporinler, sefamisinler
 - Oksasefem: Moksalaktam
 - Karbasefem: Lorakarbef
3. Tek bir beta-laktam halkası içerenler:
 - Monobaktam: Aztreonam
 - Araştırma aşamasında olanlar: Monokarbam ve monosulfaktam



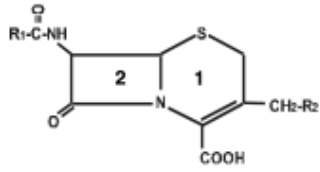
Penisilin

- 1-Tiazolidin halkası
- 2-Beta-laktam halkası
- R₁- Yan zincir



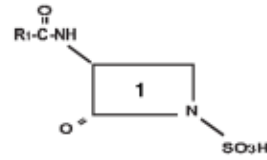
Karbapenem

- 1- Modifiye tiazolidin halkası
- 2-Beta-laktam halkası
- R, R₁- Yan zincirler



Sefalosporin

- 1-Dihidrotiazin halkası
- 2-Beta-laktam halkası
- R₁, R₂- Yan zincirler



Monobaktam

- 1-Beta-laktam halkası
- R₁- Yan zincir

Şekil-1. Başlıca beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapıları

Beta-laktam ajanların yoğun kullanımına paralel olarak, bu grup antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların sayıları da artmaktadır. Mikroorganizmalarda beta-laktam grubu antibiyotiklere başlıca 3 yolla direnç gelişmektedir:

1. PBP'lerde oluşan değişiklikler
2. İlacın hücre içine girişinin kısıtlanması ve aktif pompa sistemleri
3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi

2.2.1. PBP'lerde Oluşan Değişiklikler

Tüm PBP'ler, birçok beta-laktamazla birlikte “serin peptidazlar” ailesinin üyesidirler. PBP'ler ve beta-laktamazlar, peptidil-D-alanil-D-alanin yapısındaki peptidoglikan öncülü uç yapıların yapısal analogu olan beta-laktam molekülleri ile etkileşirler. Bu etkileşim sonucu beta-laktam halkası parçalanır ve serin ester bağlantılı açıl-enzim türevleri oluşur. Beta-laktamaz – beta-laktam molekülü etkileşiminde oluşan bu açıl-enzim ara ürününün ester bağı, su molekülleri ile hidrolize olur ve geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş penisilloil veya sefalosporil türevi ile aktif beta-laktamaz enzimi açığa çıkar. PBP'in yapısı su molekülü ile kolayca hidroliz olmaya izin vermez ve sonuçta beta-laktamazlara oranla PBP'ler çok daha yavaş deaçilasyona uğrar (16). Beta-laktamazların beta-laktam moleküllerine afinitesi ve reaksiyon hızları dirençte belirleyici olurken, PBP ile beta-laktam ajan arasındaki etkileşim ve afinite ise suşun duyarlılığını belirler.

PBP değişimine bağlı direnç çeşitli formlarda olabilir:

- PBP'in aşırı üretimi
- Dışarıdan düşük afiniteli PBP'in kazanılması
- Duyarlı PBP ile daha dirençli PBP'nin rekombinasyonu
- Nokta mutasyonları ile daha düşük afiniteli PBP'in oluşumu

Ayrıcalıklı durumlar olmakla birlikte, PBP değişimine bağlı direnç daha çok Gram-pozitif bakterilerde görülür.

2.2.2 İlacın Hücre İçine Girişinin Kısıtlanması ve Aktif Pompa Sistemleri

Birçok beta-laktam antibiyotik, Gram-negatif bakterilerin içine dış membran proteini (Outer Membrane Protein-OMP) adı verilen, porin proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçmektedir. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin çeşitli özellikleri (elektriksel yük, çözünürlük, moleküler büyüklük gibi), beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine giriş hızını belirlemektedir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde en önemli dış membran proteinleri OmpF ve OmpC iken, *P. aeruginosa*'da OmpD karbapenemlere direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Özellikle *P. aeruginosa*'da geçirgenliğin azalmasının yanı sıra aktif pompa sistemleri de antibiyotik direncinde etkindir (17).

Son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak önem kazanan *Pseudomonas*, *E. coli* ve *Acinetobacter* suşlarında çoklu antibiyotik direncinden sorumlu olan “Multiple Drug Resistance” (MDR) aktif pompaları; antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlar gibi yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz bileşikleri tanıyarak hücreden atan membran transport proteinleridir. Bunlardan bazıları sitoplazmik membranda yerleşmiş tek bileşenli taşıyıcılardır ve substratlarını membranda yakalayarak dışarı atmaktadırlar. Gram-negatif bakterilere özgü olan “RND” taşıyıcılar ise 3 bileşenlidir. Bu 3 bölümlü pompada, sitoplazmada yerleşmiş bir pompa proteini, bir OMP ve membran füzyon proteini (MFP) adı verilen bir periplazmik protein bulunmaktadır. MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM, *P. aeruginosa*'da bulunan, AdeABC ise *A. baumannii*'de bulunan RND ailesinden aktif pompa sistemleridir (17). Kromozomal mutasyonlar sonucu aktif pompa sistemlerinin ifadesinin artması (upregulation) *P. aeruginosa*'da birçok farklı antibiyotiğe direnç gelişmesine yol açmaktadır (17).

2.2.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi

Beta-laktamaz enzimleriyle inaktivasyon, beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde, özellikle Gram-negatif bakterilerin en sık kullandığı bir mekanizmadır. Beta-laktamazlar sayıları günümüzde 400'e yaklaşan, yapısal olarak benzerlik gösteren heterojen bir enzim grubudur. Beta-laktamazlar, kromozomal, plazmit, transpozon ya da

integron kaynaklı olabilir. Sabit bir düzeyde üretilebildikleri gibi, indüklenebilir özellikte de olabilirler. Gram-negatif basillerde genellikle periplazmik aralığa salgılanırken, Gram-pozitiflerde dış ortama salgılanırlar (16).

2.3. Beta-Laktamazlar

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağınyı parçalayan, böylelikle beta-laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. PBP'ler ve birçok beta-laktamaz, aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunan proteaz ailesinin birer üyesidirler. Bu enzimler, beta-laktam halkasını parçalayarak bir açil-enzim kompleksi oluştururlar. Deaçilasyon basamağının hızı, PBP ile beta-laktamazlar arasındaki temel farklılığı oluşturur. PBP'in yapısı su molekülü ile kolayca hidroliz olmaya izin vermez ve sonuçta beta-laktamazlara oranla PBP'ler çok daha yavaş deaçilasyona uğrar (16).

Beta-laktamazlar, heterojen bir grup protein olmalarının yanı sıra, bazı yapısal benzerlikler de taşırlar. Bu enzimlerin sınıflamasında genellikle 2 yöntem ön plana çıkmıştır. Ambler sınıflamasında, beta-laktamazlar amino-asit dizgilerinin benzerliğine göre 4 sınıfa ayrılırlar (18). A, C ve D sınıfları serin beta-laktamazlardan oluşurken, B sınıfı, aktivite için çinko iyonuna gereksinim duyan metallo beta-laktamazlardan ibarettir. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması, enzimlerin çeşitli fonksiyonel özellikleri (substrat ve inhibitör profilleri gibi) dikkate alınarak yapılmıştır ve 4 ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşur (19) (Tablo-1).

2.3.1. A-Sınıfı Beta-laktamazlar:

Aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunan, birçoğu klavulanik asit ile inhibe olan, genelde plazmit gibi hareketli genetik elemanlarca kodlanan enzimlerdir. A sınıfı beta-laktamazlar, beta-laktam ajanları substrat bağlayan cepte tutan hidrojen bağlarının oluşumunu sağlayan dört yaygın bölge içerirler. $S_{70}-X_{aa}-X_{aa}-K_{73}$, $S_{130}-D_{131}-N_{132}$ (SDN ilmiği) ve $K/R_{234}-T/S_{235}-G_{236}$ motifleri beta-laktam ajanların bağlanması ve hidroliz edilmesi için gerekli olan yapılardır (16). Substrat bağlayıcı cepte yer alan "oksiyanon

deliği” de beta-laktam ajanlarla etkileşimde önemli rol oynar. 160-179. Aminoasitlerden oluşan Ω ilmiği, A sınıfı beta-laktamazlara özgü bir yapıdır.

Tablo-1. Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazların sınıflanması

Fonksiyonel Grup	Moleküler Sınıf	Öncelikli Substrat	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Kromozomal ve plazmit kökenli AmpC tipi enzimler (CMY-3b, Smar, FOX-1-5, LAT-1-4 vb)
2a	A	Penisilinler	Gram(+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Dar spektrumlu Sefalosporinler	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, sefamisinler hariç sefalosporinler, monobaktamlar	TEM ve SHV türevi GSBL'ler, PER-1-2, VEB-1-3, CTX-M-1-50, GES-1-9
2br	A	Penisilinler	IRT 1-28, SHV-10 ve 26, TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	PSE-1, PSE-3-4, SAR-1
2d	D	Oksasilin, Penisilinler	OXA tipi enzimler (OXA-1-82)
2e	A	Sefalosporinler	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenabilir beta laktamızı
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, monobaktamlar	<i>E. cloacae</i> 'nin NMC-A ve IMI-1'i ve <i>S. marcescens</i> 'in Sme-1-2 enzimleri
3	B	Karbapenemler dahil birçok beta laktam (monobaktamlar hariç)	Değişik türlerce üretilen IMP-1-21, VIM-1-12
4	?	Penisilinler	<i>Burkholderia cepacia</i> 'nin penisilinazı

Enterobacteriaceae üyelerinde en sık rastlanan A sınıfı beta-laktamazlar, TEM-1 ile SHV-1'dir. Bu enzimler temel olarak penisilinazdırlar ve sefalosporinlere karşı etkinlikleri çok azdır. Bu enzimler, günümüzde bir çok hastanede yaygın olarak rastlanan GSBL'lerin atalarıdır. GSBL'ler, birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanı sıra, oksimino sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz edebilen, klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlardır. Sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin, sefotetan) karşı etkisizdirler (TEM-52 hariç). TEM ve SHV türevi enzimlerde GSBL fenotipi kazanma açısından beş aminoasit bölgesi önem taşımaktadır: Gly 238, Ala 237, Arg 164, Asp 179 ve Asp 104. Bu aminoasit grupları enzimin aktif bölgesinde yer alan, ona şekil veren gruplardır. Özellikle 238. pozisyonundaki Gly'nin Ser, Ala veya Asp ile değişimi, TEM ve SHV tipi GSBL'lerde sık rastlanan bir durumdur.

Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç gelişimini sağlayan TEM ve SHV türevi enzimler de bulunmaktadır. Genellikle, GSBL özelliğini kazandıran mutasyonlar, enzimleri klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerin etkisine daha duyarlı hale getirmektedir. Bunun yanı sıra, enzimlerin bu tür inhibitörlere dirençli hale gelmesini sağlayan mutasyonlar da, sefalosporinlere karşı olan etkinlikte bir azalmaya yol açmaktadır. Ancak hem GSBL hem de inhibitörlere dirençli nitelikte bazı TEM türevi enzimler de mevcuttur (TEM-50 ve TEM-68). İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM-1 türevidir. SHV türevi inhibitör-dirençli enzimlere daha az rastlanır (SHV-10 ve SHV-26). Saptanmalarının güç olması nedeniyle gerçek sıklıklarının, belirtilenden daha fazla olduğu düşünülmektedir.

TEM ve SHV türevi olmayan birçok A sınıfı beta-laktamaz da bildirilmiştir. Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER grubu (PER-1, PER-2) enzimlerdir (20). PER-1 enzimi Dünya'da ilk kez bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (21). Daha sonra ülkemizde *Acinetobacter spp.* ve *Salmonella typhimurium* gibi izolatlarda da tespit edilmiş ve *P. aeruginosa*'da % 23.7, *Acinetobacter spp.*'de % 62'ye varan oranlarda saptanmıştır (22). Fransa, İtalya ve Belçika gibi Avrupa ülkelerinin yanı sıra Güney Kore'den de çeşitli suşlarda PER-1

varlığı bildirilmiştir. Bu grubun diğer üyesi olan PER-2 ise Arjantin’de *S. typhimurium* suşlarında tanımlanmıştır (23).

CTX-M tipi enzimler, *E. coli*, *S. enterica serovar typhimurium*, *Citrobacter spp.* ve *Enterobacter spp.* gibi bakterilerde saptanmışlardır. Birçok TEM ve SHV türevi GSBL’nin aksine CTX-M grubu, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidimden daha iyi hidroliz eder. Ayrıca, tazobakam ile, klavulanik asit ile olduğundan daha kolay inhibe olurlar. İçlerinden bazılarının kristal yapılarının aydınlatılması sonucu, aktif bölgelerinin esnek özellikte oluşunun GSBL fenotipi göstermelerinde önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Aminoasit dizilerinin benzerliği dikkate alınarak yapılan sınıflamada 5 ayrı grup altında toplanan CTX-M enzimlerinin sayısı günümüzde elliye bulmuştur (24). CTX-M tipi enzimleri diğer GSBL’lerden ayıran bir diğer önemli özellik de, toplum kökenli izolatlarda yayılıyor olmalarıdır (5). Ülkemizde yapılan çalışmalar, özellikle *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca*, *Salmonella typhimurium* ve *Shigella sonnei* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde, CTX-M-3 ve CTX-M-15 gibi enzimlerin sık olarak bulunduğunu göstermektedir (25, 26, 27, 28). TEM ve SHV türevi olmayan A sınıfı beta-laktamazların diğer önemli üyeleri; VEB-1, BES-1, IBI-1 ve IBI-2 olarak sayılabilir. VEB-1, bir integronca kodlandığı gösterilen ilk A sınıfı beta-laktamazdır. İntegron üzerinde bulunan diğer beta-laktamazlar arasında IBC-1 ve bazı PSE, OXA ve CARB türevleri sayılabilir.

Karbapenemler, çoğunlukla A sınıfı beta-laktamazların etkisine dayanıklıdır. Ancak bazı karbapenemazlar, A sınıfı enzimlerdir. (Sme-1, Sme-2, NMC-A, IMI-1 ve KPC-1).

2.3.2. B Sınıfı Beta-laktamazlar:

Aktif bölgelerinde “serin” bulunan sınıf A, C ve D’den farklı olarak, B sınıfı beta-laktamazlar metallo enzimlerdir ve aktiviteleri için çinko veya diğer ağır metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Bunun sonucu olarak, şelasyon yapıcı ajanlar aktivitelerini inhibe eder. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta-laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok sefalosporine direnç geliştirir. Klavulanik asit, sulbaktam

ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmezler. Aztreonam bu enzimlerin hidrolizine dayanıklıdır ancak bir inhibitör gibi davranmaz.

B sınıfı beta-laktamazlar üç alt gruba ayrılır: B₁, B₂ ve B₃. B₁ alt grubu, bazı klinik *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *K. pneumonia* ve *A. baumannii* izolatlarında rastlanan IMP ve bazı *P. aeruginosa* izolatlarında görülen VIM tipi enzimleri kapsamaktadır. B sınıfı enzimleri kodlayan genlerin dizgileri birbirine çok benzemese de (% 17-37), üç boyutlu yapıları benzerdir. Metallo enzimleri kodlayan genler integron ve plazmitler üzerinde olup, aztreonam dışında hemen hemen tüm beta-laktamları hidroliz edebilirler (29).

2.3.3. C Sınıfı Beta-laktamazlar:

C sınıfı beta-laktamazlar (Bush-Jacoby-Medeiros grup 1), kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanan, bu nedenle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella spp.* haricinde tüm Gram-negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır (30). Özellikle *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens* gibi türlerde kromozomal olarak kodlanan bu enzimler önem taşır. C sınıfı beta-laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri, penisilinlere oranla daha iyi hidroliz ederler. Bir çok C sınıfı enzim beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez.

A sınıfı enzimlerle karşılaştırıldığında, C sınıfı enzimlerin aktif bölge kavimleri daha geniştir. Bu sayede geniş spektrumlu sefalosporinlere kolayca bağlanabilirler. Aktif bölgenin esnek yapısı, açıl-enzim ara ürününü su molekülleri ile etkileşime daha elverişli bir hale getirerek, geniş spektrumlu sefalosporinlerin hidrolizini kolaylaştırmaktadır. Sefepim, grup 1 kromozomal enzimlerin hidrolizine, diğer sefalosporinlerden daha dayanıklıdır. Karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, bu enzimlerin aşırı üretimi, dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (30).

Normal şartlarda, klinik olarak önem taşıyan Gram-negatif suşlardaki C sınıfı beta-laktamaz üretimi kontrol altındadır. Bu üretimin baskılanması ve aktivasyonu, hücre duvarı sentezi ve yıkımı süreciyle yakından ilişkilidir. *ampC*'nin Ekspresyonunda, transkripsiyonel bir düzenleyici olan AmpR, hem baskılayıcı hem de aktive edici bir rol üstlenir. AmpR, bir peptidoglikan öncülü olan UDP MurNac-pentapeptid ile etkileşim halindeyken baskılayıcı işlev görür, *ampC*'yi aktive edemez. Hücre duvarı yıkım ürünü olan anhidro-MurNac-tripeptid (veya –pentapeptid) yüksek konsantrasyonlara ulaştığında, AmpR ile UDP-MurNac-pentapeptid birbirinden ayrılır ve AmpR bir aktivatör olarak görev yapar. Bazı beta-laktam ajanlar, etkileri sonucu önemli miktarda anhidro-MurNac-tripeptid (veya –pentapeptid) salınımına neden olarak, *ampC* ekspresyonunun artmasını sağlarlar. Bu tür bir “indüksiyon” durumunda, sadece antibiyotik ortamda olduğu sürece yüksek düzey beta-laktamaz üretimi söz konusudur (16).

Sürekli yüksek düzey AmpC beta-laktamaz üretimi, çoğunlukla *ampD* (sitosolik amidaz) genindeki mutasyon sonucu gelişir. Bu mutasyonun sonucu olarak, hücre içinde sürekli yüksek düzeyde anhidro-MurNac-tripeptid bulunmakta ve bu durum da, AmpR'nin *ampC* transkripsiyonunu aktive etmesine neden olmaktadır. Sürekli AmpC üretimi, *ampR* geninin delesyonu sonucu da görülebilir. Ancak bu durumda üretim genellikle düşük düzeyde kalmaktadır (16, 30).

AmpC tipi beta-laktamaz genlerinin konjugatif plazmitler üzerinde de bulunabildiği gösterilmiştir. Plazmit kaynaklı C sınıfı enzimler, birçok Gram-negatif türde ve Dünyanın birçok yerinde bildirilmiştir. Bu enzimler daha çok *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, *M. morgani* ve *K. oxytoca* gibi suşlarda saptanmıştır. Plazmit kaynaklı AmpC enzimi üreten suşlarda, porin proteinlerinin kaybı sonucu karbapenemlere de direnç geliştirebilmektedir (16).

2.3.4. D Sınıfı Beta-laktamazlar:

D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup, oksasilini hızla hidroliz edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidroliz edebilen (OXA) beta-laktamazlar, daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P. aeruginosa*'da saptanmıştır. OXA enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnci sağlar. Klavulanik asit ile çok az inhibe olmalarına rağmen, NaCl iyi bir inhibitördür. Plazmit veya integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaları, bakteriler arasında yayılmalarına katkıda bulunur (16). Bazı OXA tipi enzimler (OXA-2, OXA-10-11, OXA-14-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35) GSBL karakterindedir. Daha çok *Acinetobacter baumannii* suşlarında rastlanan bazı D sınıfı beta-laktamazlar da karbapenemaz niteliğindedir (31). Aminoasit dizilerinin benzerliğine göre 3 alt gruba ayrılan bu enzimlerin; aralarında Türkiye'nin de bulunduğu çeşitli Avrupa ülkelerinden, Singapur, Çin gibi uzakdoğu ülkelerinden, Arjantin ve Güney Afrika gibi birbirinden çok farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş suşlarda saptanmaları, önemlerini arttırmaktadır (32).

2.4. Beta-Laktamaz Genlerinin Yayılım Yolları

Antibiyotiklerin çoğu doğal veya doğal kaynaklı ürünlerin türevleri oldukları için, bunlara direnç sağlayan genler de doğada bulunmaktadır. Bu genler üç temel mekanizma ile edinilebilir (16):

2.4.1. Transformasyon:

Bazı bakteri türleri, ortamda bulunan çıplak DNA moleküllerini uygun koşullar altında, hücre içine alabilme (absorbe edebilme) yeteneğine sahiptir. Alınan bu DNA molekülü, örneğin, antibiyotiklerin etkisine daha az duyarlı bir proteini kodluyor olabilir. *Streptococcus pneumoniae*, mozaik PBP genlerini bu yolla kazanır.

2.4.2. Ekstra kromozomal, kendini eşleyebilen genetik yapılar olan plazmitlerin konjugasyonu:

Özellikle geniş bir konakçı spektrumuna sahip, F faktörü gibi plazmitlerin, çeşitli türler arasında geçişi buna örnek verilebilir. Plazmitler üzerinde kodlanan direnç genleri, başka plazmitlerin veya bakteri kromozomunun bir parçası haline gelebilirler.

2.4.3. Transdüksiyon:

Bakteriyofajların, bakteri hücresi içinde oluşmaları esnasında, kapsit proteinlerinin içine, kendi genomlarının bitişiğindeki bazı kromozomal parçaları veya kendi genomları ile yaklaşık aynı büyüklükteki (genellikle 40 kb civarı) ilgisiz bir plazmit ya da kromozom parçasını paketlemeleri ve başka bakterileri enfekte etmesi yoluyla olur.

Beta-laktamaz genleri yukarıda sözü edilen mekanizmaları kullanarak bir mikroorganizmadan diğerine geçebilirler. Beta-laktamaz genleri, bakteri kromozomunda veya plazmit, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanların üzerinde yer alabilir.

2.4.4. Plazmitler

Plazmitler, kendi kendini eşleyebilen, birçok bakteri ve maya türünde bulunan, kromozom dışı DNA segmentleridir. Genellikle halkasal bir şekle sahip olup, büyüklükleri 2-400 kb arasında değişir. Büyük plazmitler (yaklaşık 300 kb) 50-75 protein kodlayabilir. Bakteri hücresinin temel metabolik işlevleri için gereken genetik bilgi kromozom üzerinde olduğundan, genellikle plazmitlerin kaybedilmesi veya kazanılması, hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını etkilemez. Plazmit üzerinde çoğunlukla antibiyotik direnç genleri, virulans genleri ve plazmitin kendi varlığını sürdürebilmesi ve transferi için gerekli proteinler kodlanır (33).

Plazmitler, diğer plazmitlerle aynı bakteri hücresi içinde, eş zamanlı olarak varlıklarını sürdürebilme yeteneklerine göre “geçimsizlik” (incompatibility) gruplarına ayrılırlar. Birçok klasik sınıflama tekniğinin yerini, DNA problemleri ve hibridizasyon teknikleriyle yapılan testler almıştır. Plazmitler, kendilerini diğer mikroorganizmalara aktarabilme yeteneklerine göre de sınıflandırılabilirler. Bir bakteri hücresinden diğerine kendini aktarabilenlere “konjugatif” adı verilir (33). Eğer konjugatif plazmit Gram-negatif bir bakteride ise, hücrenin dışında “pilus” adı verilen protein yapısında bir kanal oluşturur ve diğer proteinlerin de yardımıyla genetik materyalin aktarımını sağlar. Konjugatif plazmitlerin Gram-pozitif bakteriler arasında aktarımı için ise, iki hücrenin doğrudan teması gereklidir. Non-konjugatif plazmitler genelde, konjugatif olanlara oranla daha küçüktür. Bazı non-konjugatif plazmitler, aynı hücrede bulunan konjugatif bir plazmitin yardımı ile “mobilize” olarak diğer hücreye aktarılabilirler. Her iki tip plazmit de, transdüksiyon veya transformasyon mekanizmaları ile bir bakteriden diğerine aktarılabilirler (33).

Bir çok salgın, tek bir suşun konal yayılımına bağlı olsa da, çeşitli türler hatta cinsler arasında direnç genlerinin taşınması ile karakterize “plazmit salgını” diyebileceğimiz durumlar da vardır (34). GSBL ve AmpC gibi, birçok beta-laktam antibiyotiğe direnç sağlayan beta-laktamaz genlerinin plazmitlerce kodlanması, yayılımlarını kolaylaştırmakta ve önemli tedavi sorunlarına yol açmaktadır (5, 20).

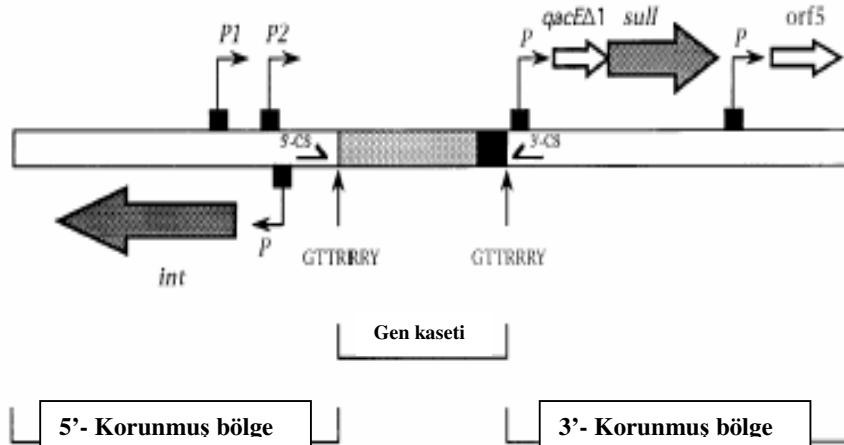
2.4.5. *Transpozonlar*

Transpozonlar, kendi kendini eşleyemeyen, ancak kendini eşleyebilen bir genetik elemandan diğerine geçebilen DNA segmentleridir. Transpozonlar, plazmitten plazmite, plazmitten bakteriyofaja, plazmitten kromozoma veya tam tersi yönde geçiş yapabilir bunun için yapısında bulunan “transpozaz” adlı enzimden yararlanır (16, 33). Bu özelliği nedeniyle, bakteri DNA’sında delesyon, inversiyon ve duplikasyon gibi olaylara yol açar. Beta-laktamaz genleri de dahil olmak üzere, birçok antimikrobiyal direnç geninin transpozonlarla ilişkisi gösterilmiştir.

Gram-pozitif bakterilerde bulunan bazı transpozonlar, kendilerinin bir kromozomdan diğerine geçişini sağlayabilirler, yani konjugatif özellikte olabilirler (16). Transpozon benzeri, ancak herhangi bir direnç geni içermeyen “insersiyon sekansları” (IS elemanları) da genetik yapıda çeşitli değişikliklere neden olabilirler. Örneğin, güçlü bir öncülü (promoter) antibiyotik direnç genlerinin önüne yerleştirip, bu genlerin ekspresyonunu arttırabilirler.

2.4.6. İntegronlar

Antimikrobiyal direnç genlerinin aktarımında integron adı verilen genetik elemanların da önemli bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır (35). İntegronlar; iki korunmuş bölge ve bunların arasında yer alan, çoğunlukla da antibiyotik direnç genlerini içeren gen kasetlerinden oluşur (36) (şekil-2). 5' Korunmuş bölgede; integraz geni (*intI*), gen kasetlerinin integre olduğu rekombinasyon bölgesi (*attI*) ve promoter bölgesi (P_c veya P_{ant}) yer alır. Farklı gen kasetlerinin ekspresyonu genelde bu promoter bölgesinin kontrolündedir ve bu yüzden integronlar "doğal ekspresyon vektörleri" olarak da adlandırılırlar. İntegronlarda gen ekspresyonu; promoter'ın gücüne, genin kopya sayısına, gen kasetinin promoter'a uzaklığına ve ek promoter bölgelerin varlığına bağlıdır (37). 3' korunmuş bölgede, etidyum bromid ve kuaterner amonyum bileşiklerine direnç gelişiminden sorumlu *qacE-1* ve sulfonamidlere direnç sağlayan *sulI* geni bulunmaktadır. İki korunmuş bölge arasında yer alan gen kasetleri; tek bir gen



Şekil-2: İntegronların genel yapısı

ile "59-baz elemanı" adı verilen özel rekombinasyon bölgesinden oluşur. Bu dizginin yapısı ve uzunluğu ait olduğu gene göre farklılık gösterir (35). 59-baz elemanlarının iki ucunda, birbirinin ters komplementeri olan, yedi bazlık iki "kor" bölgesi bulunur (GTTRRRY ve RYYAAC, R:pürin,Y:pirimidin) (38, 39). İntegraz genleri, bu rekombinasyon bölgesini tanıyıp, gen kasetlerini integronun yapısına katarlar (40). Başka bir deyişle, direnç genlerinin integron yapısına katılımı "bölgeye özgü rekombinasyon" olayı ile gerçekleşmektedir (36). Gen kasetlerini oluşturan genler ile 59-baz elemanlarının, farklı kaynaklardan evrimleştikleri düşünülmektedir (40).

İntegronların çeşitli genleri yapılarına katabilmeleri, transpozon ve plazmitlerin içeriğinde yer alabilmeleri, sadece antibiyotik direnç genlerinin yayılımında değil, bakteriyel ve plazmit genomlarının evriminde de rol oynadıklarına işaret etmektedir (36, 41).

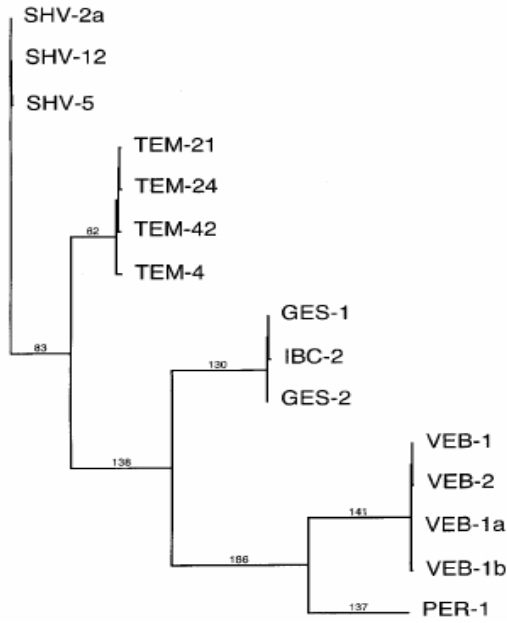
Günümüze dek 5' korunmuş bölgede yer alan integraz genindeki farklılıklar göz önüne alınarak, beş integron sınıfı tanımlanmıştır (41, 42). Bunlardan daha çok üç tanesinin (sınıf 1, 2 ve 3) direnç genleriyle ilişkili olduğu gösterilmiş olup klinik örneklerden izole edilen Gram-negatif bakterilerde en çok sınıf 1 integronlara rastlanmaktadır (43). İntegronlar hem hastane hem de toplum kaynaklı Gram-negatif bakterilerde sıklıkla rastlanan yapılardır (42, 44). İntegronlarca 40'dan fazla direnç geninin kodlandığı bildirilmiş olup, bunlar aminoglikozitler, beta-laktam ajanlar, kloramfenikol, makrolidler, sulfonamidler, antiseptik ve dezenfektanlar gibi çeşitli ajanlara direnç gelişiminden sorumludurlar (35).

2.5. PER-1 Enzimi

PER-1 enzimi, moleküler sınıf A'da yer alan, izoelektrik noktası (pI) 5,3, büyüklüğü yaklaşık 30 kD olan, TEM veya SHV türeviden olmayan bir GSBL'dir (45, 46). *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* başta olmak üzere *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes faecalis* gibi farklı Gram-negatif bakterilerde bulunabilir (47, 48, 49).

Seftazidim, sefotaksim, sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonam gibi birçok beta-laktam ajana karşı direnç geliştirir. Ancak birçok GSBL gibi karbapenem ve sefamisinlere karşı etkisizdir ve klavulanik asit ile inhibe olur (21). İncelenen çeşitli suşlarda, PER-1 enzimini kodlayan genin plazmit veya kromozom üzerinde bulunduğu, bazı suşlarda da transpozon ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (50, 51, 52).

PER-1 geninin dizi analizi; 924 bp'lik bir kodlayan bölge (open reading frame=ORF) içerdiğini, bunun 308 amino asitlik bir proteini kodladığını ortaya çıkarmıştır (45). PER-1 enzimi, TEM-SHV grubu GSBL'ler ile % 27, D sınıfı β -laktamazlar ile % 17, C sınıfı β -laktamazlar ile % 20 ve *Bacteroides vulgatus*'un CFX A enzimi ile % 40 oranında amino asit benzerliği gösterir. Bazı A sınıfı beta-laktamazlar ile PER-1'in evrimsel yakınlığı şekil-3'de gösterilmektedir. PER-1 geninin G+C oranı, 5'- ucu dizgisi ve kodon kullanım özelliği, bu genin Pseudomonas kaynaklı olmadığını düşündürmektedir (45). X ışınlarıyla incelenen üç boyutlu kristal yapısı, PER-1'de sınıf-A enzimlerinin çoğunda ortak olan, Ω halkasının katlanmış şeklinin ve 166-167. konumlar arasındaki peptid bağının farklı konformasyonda olduğunu ortaya çıkarmıştır.



Şekil-3: A sınıfı beta-laktamazlar ile PER-1'in evrimsel yakınlığı

PER-2, aminoasit dizisi açısından PER-1 ile % 86,4 benzerlik gösteren bir GSBL'dir (23). Günümüze dek Güney Amerika'da izole edilen *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* ve *Vibrio cholerae* gibi suşlarda saptanmıştır (23, 53). PZT ürünlerinin restriksiyon analizi ile PER-1/PER-2 ayırımını yapmak mümkündür. *PvuII* enzimi sadece *bla_{PER-1}*'i, *StuI* ise sadece *bla_{PER-2}*'yi kesebilmektedir (46).

PER-1 ilk kez 1991 yılında Paris'te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış ve 1993 yılında Nordmann ve arkadaşlarınca tanımlanmıştır (21). 1991-1993 yılları arasında Ankara'da izole edilmiş, seftazidim dirençli 14 *P. aeruginosa* suşunda da PER-1 saptanmıştır (50). Bu çalışmada PER-1'in 154 kb'den daha büyük bir plazmit tarafından kodlandığı ve suşların çoğunun direnci aktarabildiği gösterilmiştir.

Ülkemizde, iki merkezde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Salmonella typhimurium* izolatlarında PER-1 enzimi bulunduğu ve 81 MDa'lık plazmitlerce aktarılabilirdiği belirtilmiştir (48).

Kasım-1998 ile Ağustos -1999 arasında İtalya'da, PER-1 sentezleyen *P. aeruginosa* suşlarına bağlı bir salgın rapor edilmiştir. Bu suşların geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonam, amikasin ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin yanı sıra çeşitli dezenfektanlara da dirençli olduğu ve izole edildikleri hastaların Türk ya da Türkiye ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (46). Aynı tarihlerde Belçika'da da PER-1 üreten *P. aeruginosa*'lara bağlı, yine Türkiye ile ilişkili olmayan bir salgın bildirilmiştir. 2001-2002 Yıllarında Kore'de izole edilen *Acinetobacter* suşlarında önemli oranda PER-1 saptanması, bu enzimin Türkiye dışında da yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (54). PER-1 üreten bir *P. aeruginosa* suşunda, aynı zamanda, karbapenemlere direnç gelişiminden sorumlu VIM-2 metallo beta-laktamazının ve yine PER-1 sentezleyen bir *Proteus mirabilis* suşunda GSBL özelliğindeki TEM-52'nin saptanması, *Alcaligenes faecalis* ve *Providencia rettgeri* gibi farklı Gram-negatif bakterilerde de görülmesi, PER-1 sentezleyen suşlarla gelişen infeksiyonların önemini arttırmaktadır (55, 56, 57).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda, PER-1'in tanımlanmasında, izoelektrik odaklama (İEO), antibiyogram paterni/çift disk sinerji testi gibi fenotipik yöntemler ile, koloni hibridizasyon, PZT, dizi analizi gibi genotipik yöntemler bir arada kullanılmıştır (21, 45, 47). PER-1 enziminin daha çok *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi hastane infeksiyonu etkeni, çoğul dirençli suşlar tarafından sentezlendiği gözlenmektedir. Bu suşlarda aynı zamanda AmpC tipi enzimlerin aşırı üretimi, metallo beta-laktamazlar ve OXA türevleri gibi farklı grup enzimlerin eş zamanlı ekspresyonu, dış membran geçirgenliğinde azalma ve aktif pompa sistemleri gibi direnç mekanizmalarının devreye girmesi söz konusu olduğundan, PER-1 enzimi varlığının antibiyogram paterni veya çift disk sinerji yöntemi gibi fenotipik yöntemler ile taranmasını güçleştirmektedir. TEM-1 gibi beta-laktamazların izoelektrik noktalarının PER-1'e çok yakın oluşu ve çeşitli faktörlerin etkilerine çok duyarlı bir yöntem olması nedeniyle, izoelektrik odaklama tekniği de tanımlamada tek başına kullanılamamaktadır. PZT ve dizi analizi en güvenilir yöntemlerdir (58).

PER-1 enzimi, İtalya, Fransa ve Belçika gibi çeşitli Avrupa ülkelerinde daha çok yoğun bakım servisleriyle ilişkili *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında saptanmıştır. İtalya'da bir hastanede Şubat-1997 ile Ocak-1998 tarihleri arasında izole edilmiş, 70 GSBL (+) *Proteus mirabilis* suşundan 52 'sinin PER-1 probu ile reaksiyon verdiği bildirilmiştir (56). Kore'de 2001 ve 2002 yılları arasında izole edilen, *Acinetobacter* spp. suşlarının % 54,6'sı PER-1 üretirken, incelenen *P. aeruginosa* suşlarının hiçbirinde bu enzime rastlanmamıştır (54). Türkiye'de sekiz üniversite hastanesinde, yaklaşık üç aylık bir süre içinde, hastane kaynaklı *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve *K. pneumoniae* türlerinde, koloni hibridizasyon ve İEO teknikleriyle PER-1 varlığı araştırılmış, *P. aeruginosa*'da % 11, *Acinetobacter* spp.'de % 46 PER-1 pozitifliği saptanırken, *K. pneumoniae* suşlarının hiçbirinde belirlenememiştir (47). Aynı tarihlerde, ülkemizde üç farklı hastaneden, üç aylık bir süreçte izole edilmiş hastane kaynaklı *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında PER-1 oranları; sırasıyla % 23,7 ve % 62'dir (22). İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, yoğun bakım servislerinden 1999-2000 yılları arasında izole edilmiş seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının % 86'sında PER-1 enzimi saptanmış, bu

suşların % 48'inin aynı zamanda OXA-10 türevi beta-laktamaz taşıdığı belirlenmiştir (59).

PER-1 üreten suşların geniş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamların yanı sıra, aminoglikozitler, florokinolonlar ve karbapenemlere de direnç geliştirebilmeleri tedavide önemli sorunlara yol açmaktadır. Sıçanlarda, PER-1 üreten *P. aeruginosa* ile gelişmiş pnömoni modelinde çeşitli antibiyotiklerin etkinliklerinin denendiği bir çalışmada, toplam 60 saatlik bir tedavi süreci sonrasında, sefepim ve piperasilintazobaktam'ın tek başlarına dokudaki bakteri sayısını azaltamadıkları, imipenem ve daha az oranda olmakla birlikte amikasinin ise bakteri sayısını azalttığı saptanmıştır (60). Aynı çalışmada, beta-laktam bir ajan ile amikasin kombinasyonunun, beta-laktam ve siprofloksasin kombinasyonundan daha etkili olduğu, en iyi tedavi seçeneğinin ise imipenem + amikasin olduğu belirlenmiştir. PER-1 ve/veya OXA-10 türevi enzim sentezleyen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının siprofloksasin ve beş beta-laktam ajana duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada; PER-1 üreten *Acinetobacter* suşlarında, sefoperazon-sulbaktamın; seftazidim, sefepim, sefaperazon ve siprofloksasinden 8-16 kat daha etkili olduğu, imipenemin ise her iki türde de en etkili antibiyotik olduğu ortaya konmuştur (22). PER-1 sentezleyen suşların tedavisinde imipenem önemli bir yere sahip olmakla birlikte, yoğun kullanım sonucu, metallo beta-laktamaz üreten bakterilerin hastane ortamında çoğalmasına yol açabilmektedir (46). PER-1 sentezleyen suşlara bağlı salgınların kontrol altına alınmasında, rutin hastane infeksiyonu önlemlerinin yanı sıra akılcı antibiyotik kullanım politikalarının uygulanması da önem taşımaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Suşlar

Çalışmaya, Dokuz Eylül Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 1998-2003 yılları arasında izole edilen, seftazidime dirençli, 117 *Pseudomonas aeruginosa*, 92 *Acinetobacter baumannii*, 52 *Klebsiella pneumoniae*, 24 *Escherichia coli*, üç *Stenotrophomonas maltophilia* ve bir *Alcaligenes faecalis* olmak üzere toplam 289 Gram negatif bakteri alındı (Tablo-2). Bunların 65'i 1998-2000 yılları arasında, 62'si 2001, 67'si 2002 ve 95'i 2003 yılında izole edilmiş suşlardan oluşmaktaydı. Tüm izolatların tür ayrımı, biyokimyasal ve üreme özelliklerinin yanı sıra, API 20 NE ve API 20 E sistemleri (Bio-Merieux, France) kullanılarak yapıldı.

Tablo-2. Çalışmaya alınan izolatların yıl ve türlere göre dağılımı

TÜR	YIL				TOPLAM
	98-2000	2001	2002	2003	
<i>P. aeruginosa</i>	25	23	31	38	117
<i>A. baumannii</i>	15	21	20	36	92
<i>K. pneumoniae</i>	21	14	10	7	52
<i>E. coli</i>	3	4	6	11	24
<i>S. maltophilia</i>	1	-	-	2	3
<i>A. faecalis</i>	-	-	-	1	1
TOPLAM	65	62	67	95	289

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya alınan suşların seftazidim, piperasilin, aztreonam, sefotaksim, sefepim ve imipenem duyarlılıkları, “National Commmittee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) önerileri doğrultusunda, disk difüzyon yöntemi ile belirlendi (61). Bu amaçla, 0,5 McFarland bulanıklık eşdeğerinde hazırlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton agar besiyerine (Oxoid, İngiltere) homojen olarak yayıldı. Üzerine seftazidim (30 µg), piperasilin (100 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefepim (30 µg) ve imipenem (10 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) yerleştirilip, 16-18 saat inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. 3. Kuşak sefalosporinlere duyarlı olmayan suşlarda, çift disk sinerji yöntemi kullanılarak, amoksisilin-klavulanik asit (20 µg + 10 µg) diski ile aztreonam, seftazidim ve sefepim diskleri arasındaki sinerji incelendi. Bu amaçla, çift disk sinerji yönteminin, diskler arası mesafeyi 1 cm’ye indiren bir modifikasyonu kullanıldı (62). Ayrıca, *bla_{PER-1}* ve/veya *bla_{GES}* enzimlerini üreten *P. aeruginosa* suşlarının antibiyogramlarında IMP ve CAZ diskleri arasında sinerji görülebileceği belirtildiğinden, çalışmaya alınan suşlarda bu iki disk arasındaki sinerji de araştırıldı (21, 58).

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ile *bla_{PER-1}* geni taşıdığı saptanan suşların, seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri, NCCLS önerilerine göre mikro-dilüsyon yöntemi ile saptandı (61). Üremenin görümediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MİK değeri olarak kabul edildi. Tüm deneylerde PER-1 ürettiği bilinen bir *P. aeruginosa* suşu pozitif kontrol, PER-1 üretmediği bilinen *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.3. PER-1 Enziminin PZT Yöntemiyle Araştırılması

Bakteri hücrelerinden DNA eldesi için, Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) üzerinde üreyen kolonilerden 5-10 tanesi 500 µl steril distile suda süspanse edilip, ardından kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Standart masa-üstü santrifüjde (Eppendorf-5415C, Almanya) 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PZT reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

PZT reaksiyon karışımı 50 µl hacminde, aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x Taq buffer	1x
MgCl ₂	1.25 mM
dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya)	200 µM
Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)	1.5 U
PER-1A primeri*	20 pmol
PER-1B primeri*	20 pmol
DNA ekstraktı	5 µl
Steril deiyonize su	32.2 µl

(*) Bakınız Tablo-3.

Amplifikasyon protokolü, PZT karışımının 5 dk. 94 C° de denatürasyonunun ardından, 30 siklus olacak şekilde: 1 dk. 90 C° de denatürasyon, 1 dk. 53 C° de birleşme, 2 dk. 72 C° de uzama ve son olarak da 5 dk. 72 C° de tutulması ile gerçekleştirildi. PZT ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış %1'lik agaroz (Sigma, USA) jelde 120 volt'ta 45 dk. yürütülüp ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntülendi. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Litvanya) yardımıyla, oluşan bantların moleküler büyüklükleri belirlendi.

3.4. PER-1 Üreten İzolatların Klonal Yakınlıklarının Araştırılması

Bu amaçla kullanılacak bakteri DNA'sı aşağıdaki yöntemle elde edildi (63):

- Kanlı agarda 16-18 saatlik inkübasyonla canlandırılan bakterinin 500 µl steril deiyonize suda süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon, kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu.
- Kaynatmanın ardından, standart masa-üstü santrifüjde 5000 rpm'de 10 dakika santrifügasyon uygulandı.
- Üst kısım temiz bir tüpe alınıp, üzerine eşit miktarda fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1, pH: 7.6-8) hazır karışımı (Applichem, Almanya) eklendi. Karışım 30 saniye vortekste tutulduktan sonra 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki berrak kısım, ara faza dokunmadan steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine hacminin 1/10'u kadar 3M sodyum asetat (pH: 5.2) ve 2.5 katı kadar saf etanol eklenip hafifçe alt üst edildi.
- Tüpler -20 C°'de bir gece tutuldu.
- Ardından, 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Pellete dokunmadan üst sıvı faz uzaklaştırılıp, pellet 250 µl %70 etanol ile yıkandı.
- Tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, üst kısım uzaklaştırıldı ve pelletin iyice kuruması beklendi.
- Pelletin üzerine 50 µl Tris-EDTA tamponu (pH: 8) eklenip, pipetajla homojenize edildi.

“Enterobacterial repetitive intergenic consensus – ERIC” dizgilerine özgü ERIC-2 primeri (Tablo-2) kullanılarak, PZT tekniğiyle izolatlar arasındaki klonal yakınlık araştırıldı (64). Bu amaçla 50 µl'lik reaksiyon karışımı aşağıdaki bileşenlerle oluşturuldu:

10 x Taq buffer	1x
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya)	200 µM
ERIC-2 primeri*	25 pmol
Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)	2.5 U
DNA ekstraktı	5 µl
Steril deiyonize su	28.5 µl

*Bakınız Tablo-3

Bir siklus (95 C°'de 1 dk.); 30 siklus (94 C°'de 1 dk., 40 C°'de 1 dk., 72 C°'de 1 dk.); ve 72 C°'de 5 dk. olacak şekilde amplifikasyon basamağı uygulandı. Elde edilen ürünler, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış %1'lik agaroz (Sigma, USA) jelde 120 volt'ta 45 dk. yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Litvanya) ve MassRuler™ DNA Ladder-Mix (Fermentas, Litvanya) yardımıyla, oluşan bantların moleküler büyüklükleri belirlendi.

Tüm bantları bire-bir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir ve iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi. $S_j = n_{AB} / (n_{AB} + a + b)$ formülüne göre hesaplanan "Jaccard" katsayısı esas alınarak, "Mega" programında "UPGMA" yöntemiyle, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları için dendogramlar oluşturuldu (65). ($n_{AB} = A$ ve B suşlarında ortak olan bant sayısı, $a = A$ suşunda olup B 'de olmayan bant sayısı, $b = B$ suşunda olup, A 'da olmayan bant sayısı)

3.5. *bla*_{PER-1} PZT Ürünlerinin Restriksiyon Analizi

Yıllara göre, her ERIC-PCR paternini temsil eden birer suş seçilip, bu suşların *bla*_{PER-1} PZT ürünleriyle, uygun koşullarda *Pvu-II* ve *Stu-I* (Fermentas, Litvanya) enzimleri kullanılarak restriksiyon analizi yapıldı (*bla*_{PER-1} *Stu-I* ile, *bla*_{PER-2} *Pvu-II* ile kesilememektedir (46)). Bu amaçla, 10 µl PZT ürünü ile 5U *Pvu-II* veya *Stu-I* enzimi,

37 C°'lik su banyosunda birbuçuk saat tutuldu. Ardından, reaksiyon içeriği 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış %1'lik agaroz (Sigma, USA) jelde 120 volt'ta 45 dk. yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder-Plus (Fermentas, Litvanya) yardımıyla, oluşan bantların moleküler büyüklükleri saptandı.

3.6. PER-1 Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması

İEO için Matthew ve arkadaşlarının bildirdiği yöntem esas alındı (66). Buna göre; yatak nutrient agar (Oxoid, İngiltere) besiyeri yüzeyinde üreyen bakteriler, 0.2 M fosfat tamponu (pH:7.0) ile toplanarak steril mikrosantrifüj tüplerine alındı. Ardından, 15 sn aralıklarla, "amplitude" değeri 60 olacak şekilde gerçekleştirilen sonikasyon işlemiyle (Sonics and Materials-VC 100, ABD) bakteri hücre duvarları parçalandı. Bakteri sonikatlarının, standart masa-üstü santrifüjde, 7000 rpm'de, 10 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant İEO için kullanıldı.

İEO işleminin gerçekleştirildiği jel aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Distile su	25 ml
Akrilamid 100g + bisakrilamid 2.7 g (300 ml distile su)	9 ml
% 40 Amfolin (pH: 3-10 aralığında)	2 ml
% 5 N,N,N,N, tetra metil etilendiamin (TEMED)	0.2 ml
Riboflavin (2 mg / 100 ml distile su)	4.5 ml

Bakteri sonikatları, güneş ışığında 4-5 saat bekletilerek polimerize edilen İEO jeline yüklenerek, 1 gece; güç: 1 watt, voltaj: 180 volt, akım: 20 mAmp olacak şekilde yürütüldü. Ardından, jel nitrosefin (500 µg/ml) ile kaplanarak, beta-laktamaz bantları görünür hale getirildi. Test suşlarındaki enzim veya enzimlerin izoelektrik noktaları,

bilinen kontrolleri (TEM-1 (pI:5.4), SHV-2 (pI:7.6), PER-1 (pI: 5.3) ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.7. GSBL-Pozitif ve/veya İmipenem ve Seftazidim Diskleri Arasında Sinerji Saptanan Non-Fermantatif Bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin PZT ile Araştırılması

Çift disk sinerji yöntemiyle GSBL varlığı saptanan ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji görülen non-fermantatif suşlarda TEM ve SHV grubu enzimlerin varlığı, özgül primerler kullanılarak PZT yöntemiyle araştırıldı. Bu reaksiyonlarda kullanılan kalıp DNA için; Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) üzerinde üreyen kolonilerden 5-10 tanesi 500 µl steril distile suda süspansiyon edilip, ardından kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Standart masa-üstü santrifüjde 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PZT reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

TEM ve SHV enzimleri için, 50 µl'lik PZT reaksiyon karışımları aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x Taq buffer	1x
MgCl ₂	1.25 mM
dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya)	200 µM
Primer-1* (TEM-F veya SHV-F)	20 pmol
Primer-2* (TEM-R veya SHV-R)	20 pmol
Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)	2.5 U
DNA ekstraktı	5 µl
Steril deiyonize su	31 µl

* Bakınız Tablo-3

TEM grubu için uygulanan amplifikasyon protokolü; 94 C°de 3 dk., 30 siklus olacak şekilde 94 C°de 30 sn, 56 C°de 1 dk., 72 C°de 2 dk. ve 72 C°de 5 dk. şeklinde düzenlendi. SHV grubu için ise; 94 C°de 3 dk. 30 siklus olacak şekilde 94 C°de 30 sn, 60.5 C°de 30 sn, 72 C°de 1 dk ve 72 C°de 5 dk. olarak gerçekleştirildi.

PZT ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış %1'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde 120 volt'ta 45 dk. yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder-Plus (Fermentas, Litvanya) yardımıyla, oluşan bantların moleküler büyüklükleri belirlendi.

3.8. PER-1 Enziminin Aktarılabirliğinin İncelenmesi

3.8.1. Konjugasyon Deneyleri

bla_{PER-1} Geninin aktarılabirliğinin incelenmesi amacıyla, streptomisine dirençli ve laktozu fermente etmeyen *E. coli* K 12 suşunun (J 62-2) kullanıldığı konjugasyon deneyleri hem katı hem de sıvı ortamda yapıldı (67). Bu amaçla, alıcı ve verici suşlar Nutrient Broth (Merck, Almanya) besiyerinde bir gece 37 C°de inkübe edilip 10:1 oranında karıştırıldı. Aynı zamanda, kontrol amacıyla, streptomisin (1000 µg/ml) ve seftazidim (2 µg/ml) veya ampisilin (10 µg/ml) içeren Mueller Hinton agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekim yapıldı. Sıvı ortamda yapılan deneylerde bu karışım 35 C°de 18 saat tutulduktan sonra, 3000 rpm'de (Kendro Laboratory Products, Heraeus-Labofuge 400R, Almanya) 20 dk santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 5.6 ml serum-fizyolojik ile süspanse edilip, bundan direk, 1/10 ve 1/100 oranlarında dilüsyonlar hazırlanıp, 100'er µl'si seçici plaklara pasajlandı. 35 C°de Bir gece inkübe edilen bakteriler bir kez daha antibiyotikli besiyerlerine ekilip, oluşan koloniler daha sonra antibiyotik içermeyen "Eosin Methylene-Blue" EMB agar (Merck, Almanya) besiyerlerine aktarıldı. Burada gelişen kolonilerin biyokimyasal özellikleri ve izoelektrik odaklama yöntemiyle içerdikleri enzimlerin belirlenmesiyle, istenilen transkonjugantlar olup olmadıkları değerlendirildi.

Deneyin katı ortamda gerçekleştirilen versiyonunda, 10:1 oranında karıştırılan alıcı ve verici suşlar 35 C°'de 2 saat tutulup, 3000 rpm'de (Kendro Laboratory Products, Heraeus-Labofuge 400R, Almanya) 20 dk santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılıp, çökelti 5.6 ml serum-fizyolojik ile süspanse edildi. Bu süspanseyondan, 100 µl Nutrient Agar besiyerlerine ekim yapıp 35 C°'de 18 saat inkübe edildi. Sonraki aşamalar sıvı ortamdaki ile aynı şekilde gerçekleştirildi. Konjugasyon aşamasından önce antibiyotikli besiyerlerine yapılan kontrol ekimlerinde üreme olması durumunda, streptomisin konsantrasyonu 1500 µg/ml'ye kadar yükseltildi. Deneyler, diğer tüm şartlar aynı olmak üzere, inkübasyonlar 37 C°'de yapılarak tekrarlandı.

3.8.2. Plazmit İzolasyonu

Her bir ERIC-PZT paterninden birer örnek seçilip, bu suşlarda "Nucleospin-Plasmid" kiti (Macherey-Nagel, Almanya), Birnboim yöntemi (68), Kado-Liu yöntemi (69) ve bu yöntemin bir modifikasyonunu (50) kullanarak plazmit ekstraksiyonu yapıldı. Ticari kitle çalışılırken, 2 mg/L seftazidim içeren Nutrient Broth besiyerleri kullanıldı ve üreticinin önerileri doğrultusunda hareket edildi.

Birnboim yöntemiyle plazmit izolasyonu için öncelikle aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

1. Çözelti:	2. Çözelti:	3. Çözelti:
5 mM sükroz	0.2 N NaOH	3 M sodyum asetat
10 mM EDTA	%1 (ağırlık/hacim) SDS	pH: 4.8
25 Mm Tris, pH: 8.0		

- Bakteriler, 1.5 ml nutrient broth (Merck, Almanya) besiyerlerinde 1 gece 35 C°'de inkübe edildi.
- Tüpler, standart masa-üstü santrifüjde 10000 rpm'de 1 dk çevrilip, üstteki sıvı tamamen uzaklaştırıldı.

- 100 µl 1. Çözelti eklenip, vorteksenerek pellet süspanse edildi.
- 200 µl 2. Çözelti ilave edilip, tüpler alt-üst edilerek karıştırıldı.
- 3-5 Dakika beklendikten sonra 150 µl 3. çözelti eklenip, yine alt-üst edilerek karıştırıldı ve 15-30 dakika buzun üzerinde tutuldu.
- Tüpler, standart masa-üstü santrifüjde 10000 rpm'de 5 dk çevrildi.
- Süpernatant, 1.5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüplerine alınıp, üzerine 1 ml % 95 etanol eklendi ve karıştırıldı.
- Tüpler, standart masa-üstü santrifüjde 5000 rpm'de 15 dk çevrildi. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırılıp, pellet 0.5 ml % 80 etanol ile yıkandı ve kuruması beklendi.
- Pellet, 100 µl TE tamponu (pH: 8, 40 mM Tris-asetat + 2 mM Na-EDTA) ile süspanse edildi.
- Bu süspansiyondan yaklaşık 20 µl alınıp, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış % 0.8'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde 120 volt'ta 1 saat yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. λ DNA / Hind III (Fermentas, Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Kado-Liu yöntemi için öncelikle aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

Eritme Çözeltisi:

0.6 g trizma HCl / 50 ml distile su

4 g sodyum dodesil sülfat (SDS)

3 M NaOH ile pH: 12.6'ya ayarlanıp, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı

Fenol-Kloroform Karışımı:

50 g Kristalize Fenol

50 ml Kloroform

Kado-Liu yöntemiyle plazmit ekstraksiyonu aşağıdaki basamaklar izlenerek gerçekleştirildi:

- Bakteriler, 3 ml Nutrient Broth (Merck, Almanya) besiyerinde bir gece 35 C°'de inkübe edildi.

- Bu kültürlerden 1.5 ml alınarak, mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler standart masa-üstü santrifüjde 12000 rpm’de 1 dk çevrilip, üstteki sıvı tamamen uzaklaştırıldı.
- Çökeltinin üzerine 50 µl TE tamponu (pH: 8, 40 mM Tris-asetat + 2 mM Na-EDTA) ve 150 µl eritme çözeltisi ilave edilip, karışım iyice süspanse edildi.
- Tüpler 56 C°’lik su banyosunda 20 dk tutuldu.
- Tüplerin üzerine 150 µl fenol-kloroform eklenip 5 saniye vorteksle karıştırıldı ve ardından 13000 rpm’de 7 dk çevrildi.
- Üst fazdan yaklaşık 20 µl alınıp, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış % 0.8’lik agaroz (Sigma, ABD) jelde 120 volt’ta 1 saat yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. λ DNA / Hind III (Fermentas, Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.
- Eğer üst faz viskoz ise fenol-kloroform basamağı yinelenildi.

Plazmit ekstraksiyonu, Danel ve arkadaşlarının (50) uyguladığı modifiye Kado-Liu yöntemine göre de gerçekleştirildi. Bunun için; 64 mg/L seftazidim içeren 3 ml’lik nutrient broth besiyerlerinde bir gece 35 C°’de inkübe edilen bakteriler, yukarıda belirtildiği gibi santrifüj edilip, üst faz uzaklaştırıldı. Çökeltinin üzerine, 50 µl TE tamponu (pH: 8) ve 700 µl eritme çözeltisi eklenerek süspanse edildi. 65 C°’lik su banyosunda 45 dk tutulduktan sonra, 700 µl fenol-kloroform karışımı ilave edilip karıştırıldı ve ardından santrifüj edildi. Üst faz, yukarıdaki şartlarda plazmit içeriğini görüntülemek amacıyla kullanıldı.

3.8.3. Plazmitten Kurtarma

bla_{PER-1} geninin plazmit üzerinde olup olmadığını ortaya koymak amacıyla, bu geni taşıdığı PZT ile doğrulanmış, her bir ERIC-PZT paterninden seçilen örnek suşlarda plazmit DNA’dan “kurtarma” deneyi gerçekleştirildi. Bu deneylerde, DNA’ya bağlanarak, öncelikli olarak plazmit sentezini inhibe eden etidyum bromür (EB) kullanıldı (70). Bu amaçla; Nutrient Broth (Merck, Almanya) besiyerinde 37 C°’de bir

gece inkübe edilen bakteriler, son konsantrasyonları 10^6 bakteri/ml olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyondan 20 µl alınarak, 0.06-1024 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda EB içeren Nutrient Broth besiyerlerine aktarıldı. 37 C°'de bir gece inkübasyonun ardından, üremenin görüldüğü en yüksek EB konsantrasyonu içeren tüpten, tek koloni düşecek şekilde Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere) besiyerine ekim yapıldı. Burada üreyen kolonilerden, daha önce belirtildiği gibi kaynatma yöntemiyle DNA izole edilip, spesifik primerlerle PER-PZT yapıldı. Ayrıca, seftazidim duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle de belirlendi. Daha önce *bla_{PER-1}* varlığı gösterilmiş suşların, plazmit veya plazmitlerinden kurtarıldıktan sonra, PER-PZT sonuçlarının negatif olması, söz konusu genin plazmit üzerinde olduğu şeklinde yorumlandı.

3.9. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığının ve Epidemiyolojik Değerinin PZT ile Araştırılması

bla_{PER-1} saptanan suşlarda, sınıf-I integronların varlığı ve epidemiyolojik değeri, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZT ile araştırıldı (36). Bunun sonucunda elde edilen verilerin epidemiyolojik değeri, ERIC-PZT sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Bu amaçla uygulanan PZT aşağıdaki şekilde oluşturuldu (71):

10 x Taq buffer	1 x
MgCl ₂	3 mM
dNTP karışımı	200 µM
5'-CS* primeri	50 pmol
3'-CS* primeri	50 pmol
Taq DNA polimeraz	2.5 U
DNA ekstraktı	5 µl
Steril deiyonize su	27.5 µl

*Bakınız Tablo-3

Uygulanan çalışma protokolü:

95 C° 10 dk	94 C° 1 dk	x12	94 C° 1 dk	x12	94 C° 1 dk	x12
	55 C° 1 dk		55 C° 1 dk		55 C° 1 dk	
	72 C° 5 dk		72 C° 6 dk		72 C° 7 dk	

PZT ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış % 1'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde 120 volt'ta 1 saat yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

3.10. PER-1 Enziminin Sınıf-1 İntegronlarla İlişkinin PZT ile Araştırılması

PER-1 Enziminin integron kökenli olup olmadığını ortaya koymak için, sınıf-1 integronların 5' korunmuş bölgesinde yer alan ve *attI* rekombinasyon bölgesine özgü 5'-CS primeri ile *bla_{PER-1}* genine özgü PER-1B primeri kombine edilerek, aşağıdaki koşullarda PZT uygulandı:

10 x Taq buffer	1x
MgCl ₂	1.25 mM
dNTP karışımı	200 µM
Hot start Taq DNA polimeraz	1.5 U
5'-CS* primeri	20 pmol
PER-1B* primeri	20 pmol
DNA ekstraktı	5 µl
Steril deiyonize su	32.2 µl

(*) Bakınız Tablo-3.

Amplifikasyon protokolü; PZT karışımının 5 dk. 95 C° de denatürasyonunun ardından, 30 siklus olacak şekilde: 1 dk. 94 C° de denatürasyon, 1 dk. 50 C° de birleşme, 1 dk. 72 C° de uzama ve son olarak da 5 dk. 72 C° de tutulması ile gerçekleştirildi. PZT ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromit içeren, 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) ile hazırlanmış %1'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde 120 volt'ta 45 dk. yürütülüp ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntülendi. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ve λ DNA / Hind III (Fermentas, Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Elde edilen PZT ürünleri, agaroz jelden DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas, Litvanya) yardımıyla izole edilip, daha önce belirtilen PER-PZT'de kalıp olarak kullanıldı. Her iki reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin, çift yönlü DNA dizi analizleri yapıldı.

3.11. DNA Dizi Analizi

Her bir ERIC-PZT paterninden birer örneğe ait PER-PZT ürünleri, integrona özgü primer ile *bla_{PER-1}*'e ait primerlerin kombine edilmesiyle elde edilen PZT ürünleri ve bunların kalıp olarak kullanıldığı PER-PZT ürünlerinde doğrudan DNA dizi analizi uygulandı. Her iki DNA ipliğinde de "BigDye™ terminator" yöntemiyle, otomatik 3730xl DNA analizöründe yapılan işlem MacroGen-Güney Kore firmasınınca gerçekleştirildi. Dizi analizi için kullanılan primerler Tablo-3'de gösterilmektedir.

Tablo-3: PZT ve dizi analizi için kullanılan oligonükleotid dizileri

Primer/Oligonükleotid Adı	Primer/Oligonükleotid Dizisi	Referans
PER-1'e özgü primerler PER-1A PER-1B	5' - ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC 5' - AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA	50
PER-1'e özgü dizi analiz primerleri PER-1C PER-1D	5' - AGG TTT TAC AGA ATA CCT GG 5' - ACA CAG CTG TCT GAA ACC TC	50
ERIC-2	5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	64
Smf-I integronlara özgü primerler 5'-CS 3'-CS	5' - GGC ATC CAA GCA GCA AG 5' - AAG CAG ACT TGA CCT GA	36
TEM grubu enzimlere özgü primerler TEM-F TEM-R	5' - GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG 5' - GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC	
SHV grubu enzimlere özgü primerler SHV-F SHV-R	5' - CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC 5' - TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA	72

4. BULGULAR

4.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

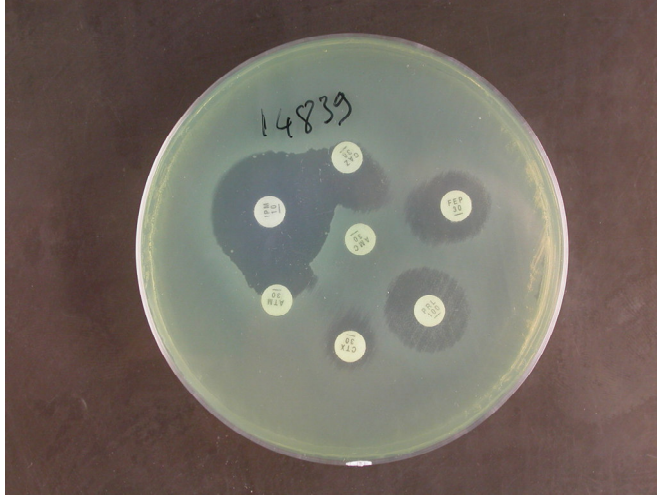
Çalışmaya alınan, toplam 289 seftazidim dirençli Gram negatif bakteriden, 65'i 1998-2000 yılları arasında izole edilmiş suşlardı. Bu suşların 25'i *P. aeruginosa*, 15'i *A. baumannii*, 21'i *K. pneumoniae*, üçü *E. coli* ve biri *Stenotrophomonas maltophilia* idi (Tablo-2). *P. aeruginosa* suşlarının seftaksim (CTX), sefepim (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IPM) ve piperasilin (PRL) antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 96, % 100, % 84 ve % 100 olarak saptandı. On üç *P. aeruginosa* suşunun antibiyogramında GSBL pozitifliği ve/veya IPM-CAZ arasında sinerji gözlemlendi (Şekil 4). *A. baumannii* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 93.3, % 100, % 26.6 ve % 100 olarak bulundu. Bir *A. baumannii* suşunda GSBL pozitifliği saptandı. *S. maltophilia* suşu ise, çalışılan tüm antibiyotiklere dirençliydi. CTX, IPM ve PRL antibiyotiklerine *K. pneumoniae* suşlarının direnç oranları sırasıyla; % 100, % 0 ve % 100, *E. coli* suşlarının direnç oranları da; % 100, % 0 ve % 100 olarak belirlendi. *K. pneumoniae* suşlarında FEP ve ATM antibiyotiklerine gözlenen direnç oranları % 61.9 ve % 95.2, *E. coli* suşlarında aynı antibiyotiklere gözlenen direnç oranları ise % 0 ve % 100 olmasına karşın, GSBL üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatları, FEP ve ATM gibi beta-laktam antibiyotiklere de dirençli kabul edildi. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının yıllara göre, antibiyotik direnç oranları Tablo-4'de, *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarınınki ise Tablo-5'de görülmektedir.

2001 Yılında izole edilen 62 bakterinin 23'ü *P. aeruginosa*, 21'i *A. baumannii*, 14'ü *K. pneumoniae* ve dördü *E. coli* suşlarından oluşmaktaydı (Tablo-2). *P. aeruginosa* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 95.7, % 100, % 78.3 ve % 95.7 olarak saptandı. Yirmi *P. aeruginosa* suşunun antibiyogramında GSBL pozitifliği ve/veya IPM-CAZ arasında sinerji gözlemlendi. *A. baumannii* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 100, % 100, % 52.4 ve %100 olarak bulundu. Dört *A. baumannii*

suşunda GSBL pozitifliği saptandı. CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine *K. pneumoniae* suşlarında gözlenen direnç oranları sırasıyla; % 92.9, % 78.6, % 100, % 0 ve % 100, *E. coli* suşlarında gözlenen direnç oranları ise; % 100, % 25, % 100, % 0 ve % 100 olarak belirlendi (Tablo-4 ve 5).

2002 Yılında izole edilen 67 bakterinin 31'i *P. aeruginosa*, 20'si *A. baumannii*, 10'u *K. pneumoniae* ve altısı *E. coli* suşlarından oluşmaktaydı (Tablo-2). *P. aeruginosa* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 93.5, % 100, % 77.4 ve % 90.3 olarak belirlendi. On beş *P. aeruginosa* suşunun antibiyogramında GSBL pozitifliği ve/veya IPM-CAZ arasında sinerji gözlemlendi. *A. baumannii* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 100, % 100, % 80 ve % 95 olarak bulundu. İki *A. baumannii* suşunda GSBL pozitifliği saptandı. CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine *K. pneumoniae* suşlarında gözlenen direnç oranları sırasıyla; % 100, % 80, % 100, % 0 ve % 100, olarak belirlenirken, *E. coli* suşlarının tamamının IPM hariç diğer antibiyotiklere dirençli oldukları gözlemlendi (Tablo-4 ve 5).

2003 Yılında, 38 *P. aeruginosa*, 36 *A. baumannii*, 11 *E. coli*, yedi *K. pneumoniae*, iki *S. maltophilia* ve bir *Alcaligenes faecalis* olmak üzere toplam 95 suş izole edildi (Tablo-2). *P. aeruginosa* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 92, % 100, % 73.7 ve % 97.4 olarak saptandı. Yirmi dört *P. aeruginosa* suşunun antibiyogramında GSBL pozitifliği ve/veya IPM-CAZ arasında sinerji gözlemlendi. *A. baumannii* suşlarının CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 100, % 100, % 100, % 33.3 ve % 100 olarak bulundu. Yedi *A. baumannii* suşunda GSBL pozitifliği ve/veya IPM-CAZ arasında sinerji saptandı. CTX, FEP, ATM, IPM ve PRL antibiyotiklerine *E. coli* suşlarında gözlenen direnç oranları sırasıyla; % 100, % 90.9, % 100, % 0 ve % 100, olarak belirlenirken, *K. pneumoniae* suşlarının tamamının IPM hariç diğer antibiyotiklere dirençli oldukları gözlemlendi. *A. faecalis* suşu CTX, FEP ve ATM'ye dirençli, PRL ve IPM'e duyarlıydı. *S. maltophilia* suşları ise çalışılan tüm antibiyotiklere dirençliydi (Tablo-4 ve 5).



Şekil-4. GSBL paterni gösteren bir *P. aeruginosa* suşu

Tablo-4. Sefotazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının, yıllara göre çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları

YIL	TÜR									
	<i>P. aeruginosa</i>					<i>A. baumannii</i>				
	Antibiyotik % Direnç (Toplam sayı)					Antibiyotik % Direnç (Toplam sayı)				
	CTX	FEP	ATM	IPM	PRL	CTX	FEP	ATM	IPM	PRL
98-2000	100 (25)	96 (25)	100 (25)	84 (25)	100 (25)	100 (15)	93.3 (15)	100 (15)	26.6 (15)	100 (15)
2001	100 (23)	95.7 (23)	100 (23)	78.3 (23)	95.7 (23)	100 (21)	100 (21)	100 (21)	52.4 (21)	100 (21)
2002	100 (31)	93.5 (31)	100 (31)	77.4 (31)	90.3 (31)	100 (20)	100 (20)	100 (20)	80 (20)	95 (20)
2003	100 (38)	92 (38)	100 (38)	73.7 (38)	97.4 (38)	100 (36)	100 (36)	100 (36)	33.3 (36)	100 (36)

CTX: Sefotaksim, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, IPM: İmipenem, PRL: Piperasilin

Tablo-5. Seftazidim dirençli *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının, yıllara göre çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları

	TÜR									
	<i>K. pneumoniae</i>					<i>E. coli</i>				
YIL	Antibiyotik % Direnç (Toplam Sayı)					Antibiyotik % Direnç (Toplam Sayı)				
	CTX	FEP	ATM	IPM	PRL	CTX	FEP	ATM	IPM	PRL
98-2000	100 (21) 100*	61.9 (21) 100*	95.2 (21) 100*	0 (21)	100 (21)	100 (3) 100*	0 (3) 100*	100 (3) 100*	0 (3)	100 (3)
2001	92.9 (14) 100*	78.6 (14) 100*	100 (14) 100*	0 (14)	100 (14)	100 (4) 100*	25 (4) 100*	100 (4) 100*	0 (4)	100 (4)
2002	100 (10) 100*	80 (10) 100*	100 (10) 100*	0 (10)	100 (10)	100 (6) 100*	100 (6) 100*	100 (6) 100*	0 (6)	100 (6)
2003	100 (7) 100*	100 (7) 100*	100 (7) 100*	0 (7)	100 (7)	100 (11) 100*	90.9 (11) 100*	100 (11) 100*	0 (11)	100 (11)

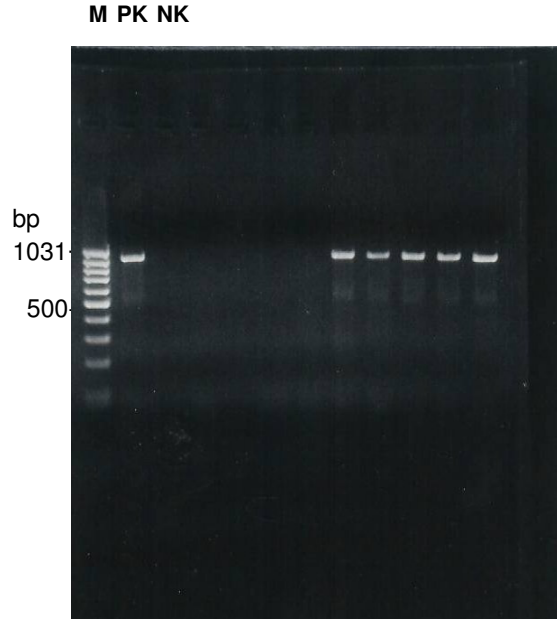
* : Yorumlanan direnç oranı

CTX: Sefotaksim, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, IPM: İmipenem, PRL: Piperasilin

4.2. PZT Yöntemiyle PER-1 Enziminin Saptanması

Çalışmaya alınan 289 seftazidim dirençli Gram negatif bakteride, *bla_{PER-1}*'e özgü PER-1A ve PER-1B primerleriyle gerçekleştirilen PZT ile PER-1 enzim varlığı araştırıldı. Seksen sekiz suşta, pozitif kontrol suşuyla aynı hizada 924 bp'lik PZT ürününün oluşmasıyla *bla_{PER-1}* varlığı saptandı (Şekil 5). *bla_{PER-1}* varlığı belirlenen suşların 54'ü *P. aeruginosa*, 33'ü *A. baumannii* ve biri de *Alcaligenes faecalis*'di. *P. aeruginosa* suşları arasında PER-1 enzimi üretenlerin oranı % 46.2, *A. baumannii* suşlarında ise % 35.9 olarak bulundu. Çalışmaya alınan izolatlar arasındaki tek *Alcaligenes faecalis* suşunda da *bla_{PER-1}* varlığı belirlendi. İncelenen hiçbir *Enterobacteriaceae* üyesinde *bla_{PER-1}*'e rastlanmadı. 1998-2000 Dönemi, 2001, 2002 ve 2003 yıllarında PER-1 enzimi ürettiği saptanan suşların oranları sırasıyla; % 32.3, %

33.9, % 14.9 ve % 37.9 olarak belirlendi. Yıllara ve türlere göre PER-1 enzimi saptanan suşların dağılımı Tablo-6'da görülmektedir.



Şekil-5. PER-1A ve PER-1B primerleriyle yapılan PZT sonucu elde edilen ürünler

M: Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

Tablo-6. Yıllara ve türlere göre PER-1 enzimi saptanan suşların dağılımı

YIL	TÜR									TOPLAM		
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>A. baumannii</i>			Diğer			Suş Sayısı	PZT (+)	%
	Suş Sayısı	PZT (+)	%	Suş Sayısı	PZT (+)	%	Suş Sayısı	PZT (+)	%	Suş Sayısı	PZT (+)	%
98-2000	25	14	56	15	7	46,6	25	-	0	65	21	32,3
2001	23	13	56,5	21	8	38	18	-	0	62	21	33,9
2002	31	7	22,6	20	3	15	16	-	0	67	10	14,9
2003	38	20	52,6	36	15	41,6	21	1	4,8	95	36	37,9

PZT yöntemiyle *bla_{PER-1}* saptanan ve saptanmayan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının çeşitli β -laktam antibiyotiklere direnç oranları Tablo-7’de görülmektedir.

Tablo-7. *bla_{PER-1}* saptanan ve saptanmayan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının çeşitli β -laktam antibiyotiklere direnç oranları

Antibiyotik	<i>P. aeruginosa</i> no (%)		<i>A. baumannii</i> no (%)		TOPLAM	
	<i>bla_{PER-1}</i> (+), n=54	<i>bla_{PER-1}</i> (-), n=63	<i>bla_{PER-1}</i> (+), n=33	<i>bla_{PER-1}</i> (-), n=59	<i>P. aeruginosa</i> , n=117 no(%)	<i>A. baumannii</i> , n=92 no(%)
Piperasilin	50 (92.6)	62 (98.4)	33 (100)	58 (98.3)	112 (95.7)	91 (98.9)
Aztreonam	54 (100)	63 (100)	33 (100)	59 (100)	117 (100)	92 (100)
Sefotaksim	54 (100)	63 (100)	33 (100)	59 (100)	117 (100)	92 (100)
İmipenem	35 (64.8)	56 (88.9)	4 (12.1)	39 (66.1)	91 (77.7)	43 (46.7)
Sefepim	53 (98.2)	56 (88.9)	33 (100)	58 (98.3)	109 (93.2)	91 (98.9)

PZT yöntemiyle PER-1 geni saptanan 54 *P. aeruginosa* suşundan 45’inde (% 83.3) ve 33 *A. baumannii* suşundan dokuzunda (% 27.3), çift disk sinerji yöntemiyle GSBL varlığı belirlendi. *bla_{PER-1}* pozitif 54 *P. aeruginosa* suşundan sadece 10’unda (% 18.5) IPM ile CAZ diskleri arasında sinerji saptanırken, 33 *bla_{PER-1}* pozitif *A. baumannii* suşundan hiçbirinde IPM-CAZ sinerjisine rastlanmadı.

4.3. PZT ile *bla_{PER-1}* Geni Taşıdığı Saptanan Suşların, Seftazidim MİK Değerleri

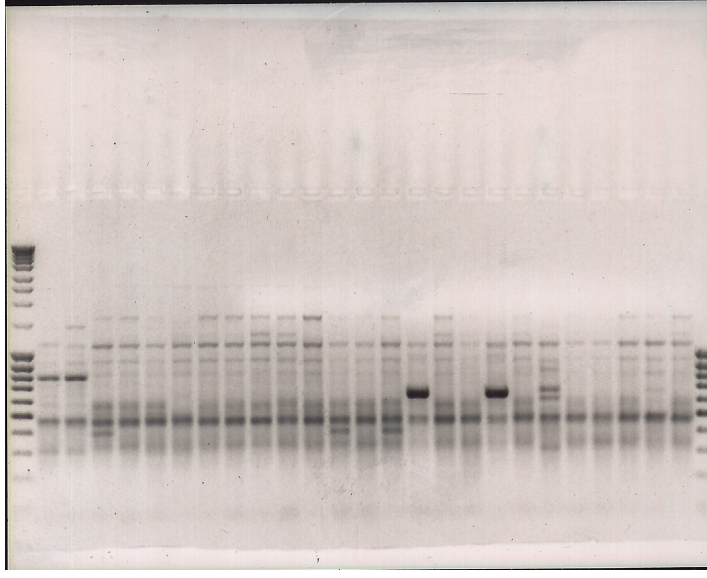
PZT ile *bla_{PER-1}* geni taşıdığı saptanan suşların, seftazidim MİK değerleri, NCCLS önerilerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile saptandı. İncelenen 88 suştan 58’inin seftazidim MİK değeri 512 μ g/ml’nin üzerinde, 15’inin 512 μ g/ml, ve 15’inin de 256 μ g/ml’di. Hiçbir suşun seftazidim MİK değeri 256 μ g/ml’nin altında değildi. PER-1 enzimi üreten suşların, izole edildikleri yıllara göre seftazidim MİK değerleri, Tablo-8’de yer almaktadır.

Tablo-8. *bla_{PER-1}* saptanan suşların yıllara göre seftazidim MİK değerleri

YIL	TÜR	MİK (µg/ml)			TOPLAM
		>512	512	256	
98- 2000	<i>P. aeruginosa</i>	7	2	5	14
	<i>A. baumannii</i>	7	0	0	7
2001	<i>P. aeruginosa</i>	5	3	5	13
	<i>A. baumannii</i>	8	0	0	8
2002	<i>P. aeruginosa</i>	5	2	0	7
	<i>A. baumannii</i>	3	0	0	3
2003	<i>P. aeruginosa</i>	7	8	5	20
	<i>A. baumannii</i>	15	0	0	15
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	1
TOPLAM		58	15	15	88

4.4. PER-1 Üreten İzolatların Klonal Yakınlıkları

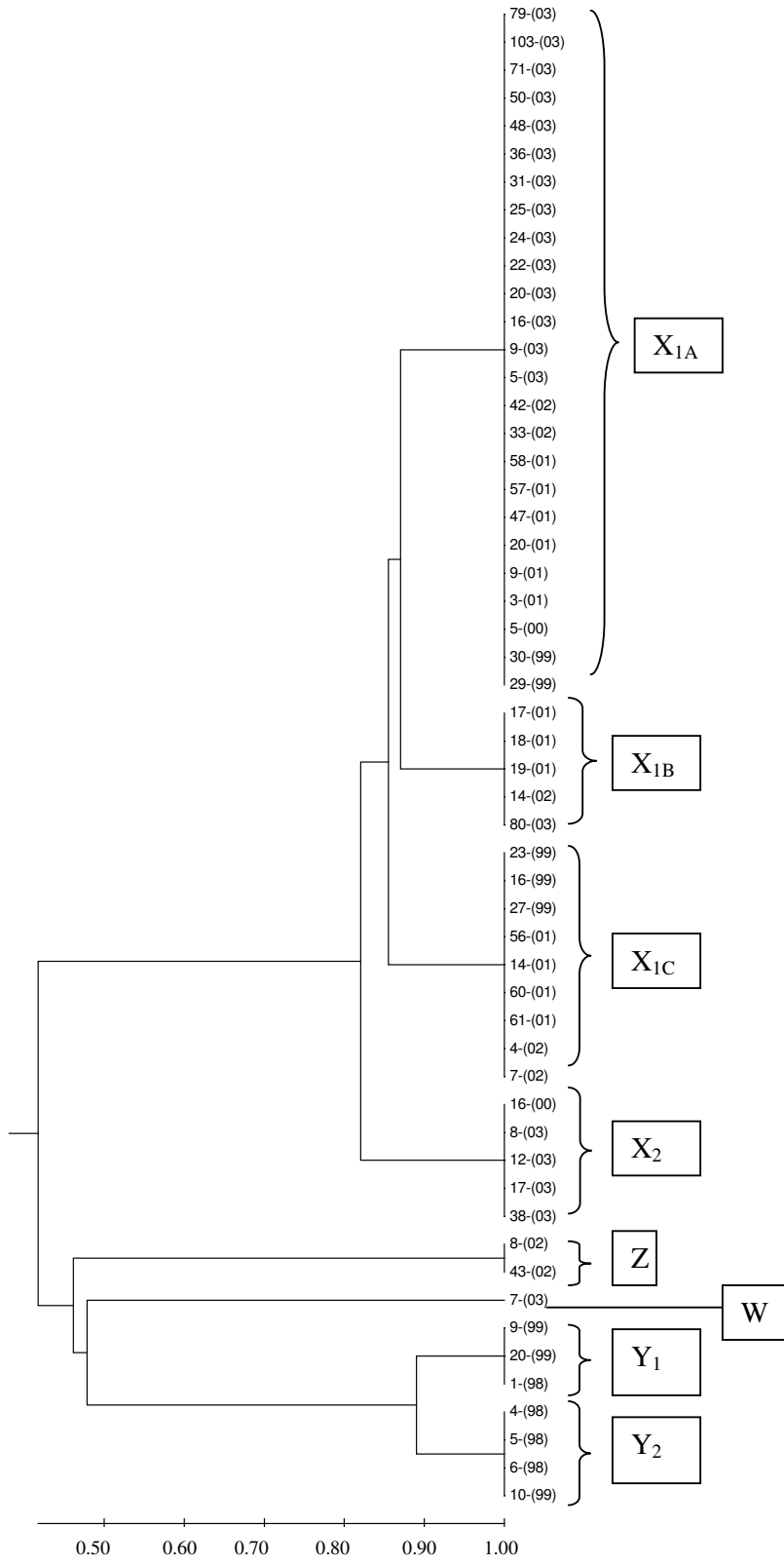
bla_{PER-1} saptanan suşların klonal yakınlıkları, “Enterobacterial repetitive intergenic consensus – ERIC” dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak, PZT tekniğiyle araştırıldı. Tüm bantları bire-bir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir ve iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi (Şekil-6).



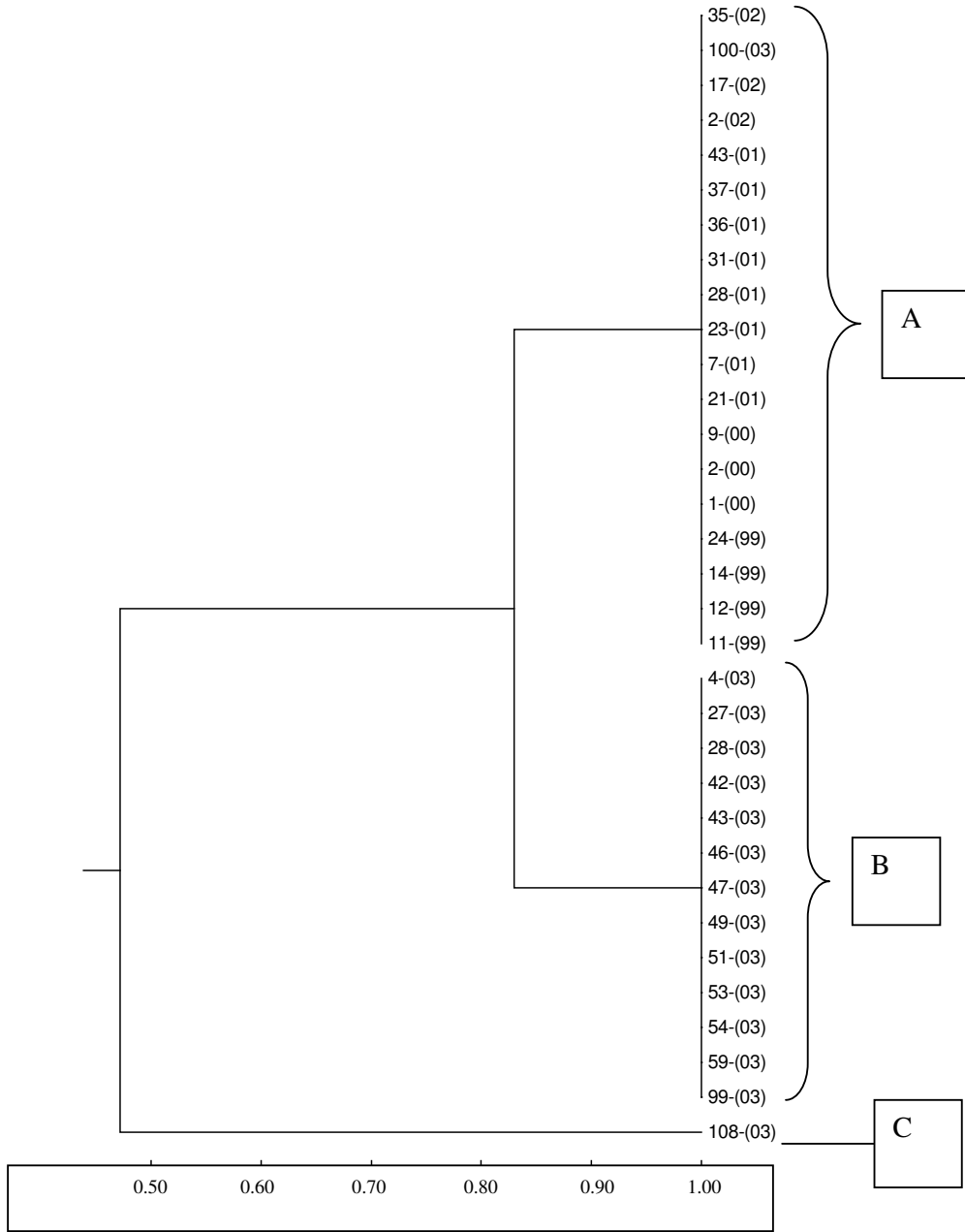
M Y₂ Y₁ X₁ X_{1A} X_{1A} X₂ X_{1A} X_{1A} X_{1B} X_{1B} X_{1A} X₁ X_{1A} X₁ Z X_{1B} X_{1A} Z X_{1A} W X₂ X₂ X_{1A} X₂ X_{1B} M

Şekil-6. *P. aeruginosa* suşlarının ERIC-PZT sonuçları (Farklı paternlere ait bazı örnekler yer almaktadır)

bla_{PER-1} saptanan *P. aeruginosa* izolatlarının çoğu iki farklı klonun üyesiydi (X ve Y). “X” klonu, dört alt gruptan oluşan ve 44 suşun olduğu en büyük klondur (X_{1A}:25, X_{1B}:5, X_{1C}:9, X₂:5). “Y” klonu ise, iki alt dala ayrılan ve yedi suşun yer aldığı bir klondur (Y₁:3, Y₂:4). Bunların dışında sadece iki suşun olduğu “Z” ve tek üyeye sahip “W” klonu mevcuttu. *A. baumannii* izolatlarında ise, 19 üyeli “A” ve 13 üyeli “B” klonlarıyla, bir suşun yer aldığı “C” klonu saptandı. “Jaccard” katsayısı esas alınarak “Mega 2.1” programında “UPGMA” yöntemiyle oluşturulan dendogramlar Şekil-7 ve Şekil-8’de görülmektedir.



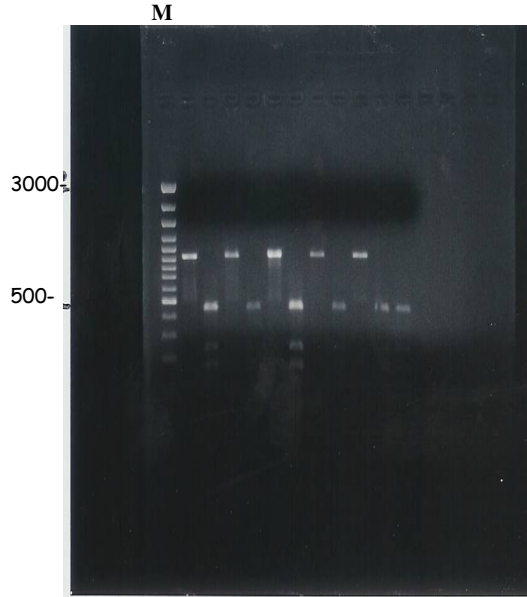
Şekil-7. PER-1 üreten *P. aeruginosa* izolatlarının dendogramı



Şekil-8. PER-1 üreten *A. baumannii* izolatlarının dendogramı

4.5. *bla*_{PER-1} PZT Ürünlerinin Restriksiyon Analizi

Yıllara göre, her ERIC-PZT paternini temsil eden birer suş seçilip, bu suşların *bla*_{PER-1} PZT ürünleriyle, uygun koşullarda *Pvu*-II ve *Stu*-I enzimleri kullanılarak restriksiyon analizi yapıldı. *bla*_{PER-1}'in *Stu*-I ile, *bla*_{PER-2}'nin de *Pvu*-II ile kesilememesi ilkesinden yararlanılarak, bu iki enzim geni ayırt edildi. Restriksiyon analizi uygulanan toplam 20 PZT ürününün *Pvu*-II ile 450, 230, 158 ve 85 bp'lik parçalara ayrılması, buna karşın *Stu*-I ile hiçbir değişime uğramaması, ürünlerin *bla*_{PER-1}'e ait olduğunu gösterdi (Şekil-9).



Şekil-9. *Pvu*-II ile 450, 230, 158 ve 85 bp'lik parçalara ayrılan PZT ürünleri

M: Marker

4.6. DNA Dizi Analizi

Her bir ERIC-PZT paterninden birer örneğe ait, PER-1A ve PER-1B primerleriyle elde edilen 12 PER-PZT ürünüde, doğrudan çift yönlü olarak DNA dizi analizi uygulandı. Sonuçların “Blastn” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) programıyla yapılan incelemesinde, bu dizilerin *bla_{PER-1}* genine ait olduğu belirlendi. PER-1A ve PER-1B’den farklı olarak, yine *bla_{PER-1}* genine özgü olan PER-1L ve PER-1R primerleri kullanılarak, dört suşta gerçekleştirilen PZT ürünlerinin DNA dizi analizi sonuçlarının da *bla_{PER-1}* geniyle uyumlu olduğu gözlemlendi.

Ayrıca, DNA dizi analizi uygulanan suşlara ait nükleotid-dizilerinin kodladığı proteinler “ExpASY Proteomics Server” (<http://www.expasy.org>) yardımıyla elde edilip, “Blastp” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) programıyla veri tabanındaki protein dizileriyle karşılaştırıldı. Karşılaştırılan protein dizilerinin tümünün PER-1 enzimiyle % 99-100 oranında uyumlu olduğu ve enzimlerinin aktif bölgelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi (Şekil-10).

SeqA Name	Len (aa)	SeqB Name	Len (aa)	Score
1-1-PER-1A	278	2-PER-1	308	100
1-1-PER-1A	278	3-PER-2	308	88
2-PER-1	308	3-PER-2	308	86


```

1-1-PER-1A      -----AQSPLLKEQIESIVIGKKATVGVAVWGPDDLEPLL
PER-1          MNVVIKAVVTASTLLMVSFSSFETSAQSPLLKEQIESIVIGKKATVGVAVWGPDDLEPLL
PER-2          MNVITKCVFTASALLMLGLSSFVSAQSPLLKEQIETIVTGKKATVGVAVWGPDDLEPLL
                *****.*
1-1-PER-1A      INPFKFPMQSVFKLHLAMLVLHQVDQGKLDLNQTVIVNRAKVLQNTWAPIMKAYQGDEF
PER-1          INPFKFPMQSVFKLHLAMLVLHQVDQGKLDLNQTVIVNRAKVLQNTWAPIMKAYQGDEF
PER-2          LNPFEKFPMQSVFKLHLAMLVLHQVDQGKLDLNQSVTVNRAAVLQNTWSPMMKDHQDEF
                :*****.*
1-1-PER-1A      SVPVQQLLQYSVSHSDNVACDLLFELVGGPAALHDYIQSMGIKETAVVANEQMHADDQV
PER-1          SVPVQQLLQYSVSHSDNVACDLLFELVGGPAALHDYIQSMGIKETAVVANEQMHADDQV
PER-2          TVAVQQLLQYSVSHSDNVACDLLFELVGGPQALHAYIQSLGVKEAAVVANEQMHADDQV
                :*.*****
1-1-PER-1A      QYQNWTSMKGAAEILKKFEQKTQLSETSQALLWKWMVETTTGPERLKGLLPAGTVVAHKT
PER-1          QYQNWTSMKGAAEILKKFEQKTQLSETSQALLWKWMVETTTGPERLKGLLPAGTVVAHKT
PER-2          QYQNWTSMKAAAQVLQKFEQKQLSETSQALLWKWMVETTTGPQRLKGLLPAGTIVAHT
                *****.*
1-1-PER-1A      GTSGIKAGKTAATNDLGIILLPDGRPLLVAVFVKDSAESRTNEAIIAQVAQTAYQFELK
PER-1          GTSGIKAGKTAATNDLGIILLPDGRPLLVAVFVKDSAESRTNEAIIAQVAQTAYQFELK
PER-2          GTSGVRAGKTAATNDAGVIMLPDGRPLLVAVFVKDSAESERTNEAIIAQVAQAAYQFELK
                ***.:*****
1-1-PER-1A      KLS-----
PER-1          KLSALSPN
PER-2          KLSAVSPD
                ***

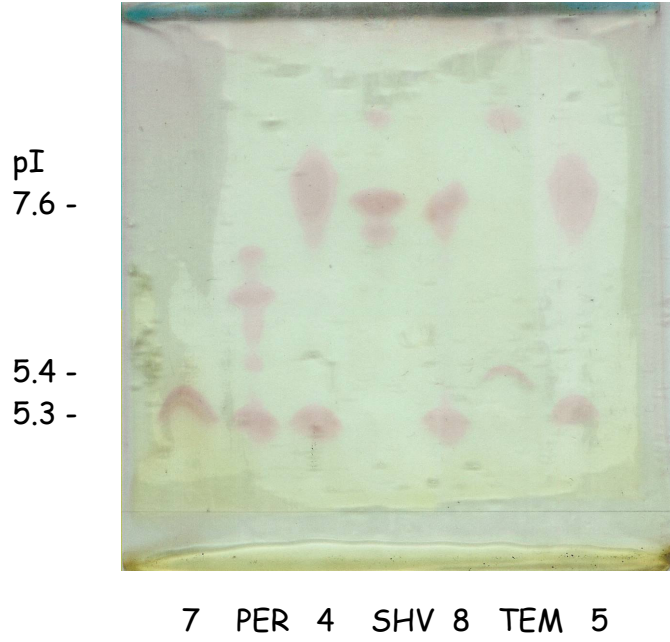
```

Şekil-10. Bir *P. aeruginosa* suşunun dizi analizi yapılan bölgesine ait protein dizisinin, “Clustal W (1.83)” programı yardımıyla PER-1 ve PER-2 ile karşılaştırılması (Koyu harfler enzimin aktif bölgesinde yer alan aminoasitleri göstermektedir)

4.7. PER-1 Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması

Yıllara göre, *bla_{PER-1}* saptanan suşlarda her farklı ERIC-PZT paterninden birer örnek seçilerek, toplam 22 suşun sonikatları hazırlandı. İzoelektrik noktaları bilinen, PER-1, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen suşların sonikatları aynı İEO jelinde yürütüldü. İncelenen tüm suşlarda, PER-1 enzimiyle aynı hızda (pI: 5.3) bant oluştuğu saptandı (Şekil-11).

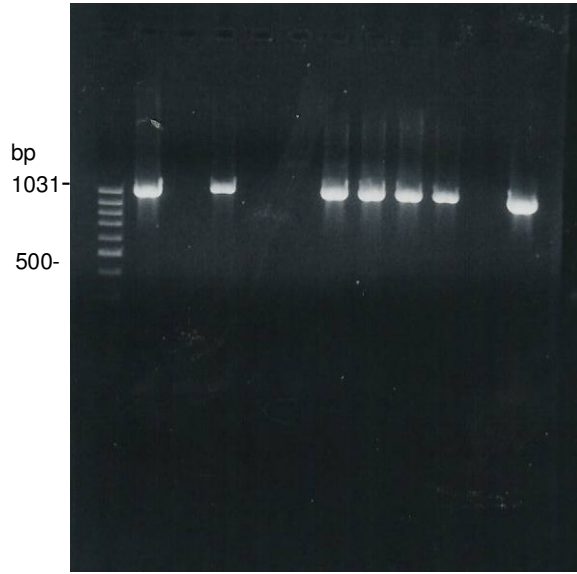
İEO uygulanan sekiz *P. aeruginosa* ve beş *A. baumannii* suşunda, PER-1 enzimine ait bandın yanı sıra, SHV-2 enzim kontrolüne yakın bantlar oluştuğu saptandı. Bu suşlarda, SHV enzim grubuna özgü primerlerle yapılan ve pozitif kontrol suşunun da kullanıldığı PZT sonucu, herhangi bir ürün oluşmadığı gözlemlendi.



Şekil-11. İsoelektrik noktaları bilinen, PER-1, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen bazı izolatların (7, 4, 8, 5) İEO jeli görüntüsü
pI: İsoelektrik nokta

4.8. GSBL-Pozitif ve/veya İmipenem ve Seftazidim Diskleri Arasında Sinerji Saptanan Non-Fermantatif Bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin Varlığı

Antibiogram plaklarında GSBL pozitifliği ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji görülen 86 non-fermantatif bakteride TEM ve SHV enzimlerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak PZT yöntemi ile araştırıldı. On dört suşta (% 16.3) TEM grubu enzim saptanırken, hiçbirinde SHV grubu enzime rastlanmadı (Şekil-12). Söz konusu 86 suşun 58'i (% 67.4) PER-1 üreten izolatlardı (Tablo-9).



Şekil-12. Özgül primerlerle TEM grubu enzim geni saptanan bazı *P. aeruginosa* suşları

Tablo-9. GSBL(+) ve/veya IPM-CAZ Arası Sinerji Görülen Non-fermantatif Suşların TEM, SHV ve PER Oranları

GSBL (+) ve/veya IPM-CAZ Arası Sinerji Görülen Non-Fermentatif Suşlar			
(n=86)			
<i>bla_{PER-1}</i> Sayı (%)	<i>bla_{TEM}</i> Sayı (%)	<i>bla_{SHV}</i> Sayı (%)	PER-1 ve/veya TEM saptanan suş sayısı (%)
58 (%67.4)	14 (%16.3)	0 (% 0)	60 (%69.8)

Antibiogram plaklarında GSBL pozitifliği gözlenen, ancak *bla_{PER-1}* saptanmayan, üç *P. aeruginosa* ve dört *A. baumannii* suşunda, TEM ve SHV grubu enzimlerin varlığı özgül primerlerle PZT yöntemiyle araştırıldı. Üç *P. aeruginosa* suşunda TEM veya SHV grubu enzimler tespit edilmedi. Dört *A. baumannii* suşunun sadece ikisinde TEM grubu enzim saptanırken, SHV grubu enzime rastlanmadı. Antibiogram plaklarında IPM ve CAZ diskleri arasında sinerji olup, *bla_{PER-1}* saptanmayan 20 *P. aeruginosa* ve bir *A. baumannii* suşunda da TEM ve SHV grubu enzimler PZT ile araştırıldı. Bu gruptan hiçbir suşta TEM veya SHV grubu enzim tespit edilmedi (Tablo-10).

Antibiogram plaklarında GSBL pozitifliği ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji gözlenen, ancak PZT yöntemiyle PER-1, TEM veya SHV grubu enzim saptanmayan 26 non-fermantatif bakterininin (23 *P. aeruginosa* ve üç *A. baumannii*) bir kısmında İEO yöntemiyle beta-laktamazlar araştırıldı. Bu suşlarda TEM-1 (pI: 5.4) ve SHV-2 (pI: 7.6) kontrolleri arasında bant oluşması, daha önce aynı türün üyelerinde saptanan GES (pI_{GES-1}: 5.8), IBC (pI_{IBC-1}: 6.9) veya VEB (pI_{VEB-1}: 7.4) gibi enzimlerin varlığını düşündürdü.

Tablo-10. GSBL(+) ve/veya IPM-CAZ Diskleri Arasında Sinerji Görülüp, *bla_{PER-1}* Saptanmayan Non-fermantatif Suşlarda TEM ve SHV Türevi Enzimlerin Oranları

GSBL(+) ve/veya IPM-CAZ Arası Sinerji Görülüp <i>bla_{PER-1}</i> (-) Olan Non-fermantatif Suşlar (n=28)							
GSBL (+) Suş : 7				IPM-CAZ Sinerjili Suş : 21			
<i>P. aeruginosa</i> (3)		<i>A. baumannii</i> (4)		<i>P. aeruginosa</i> (20)		<i>A. baumannii</i> (1)	
TEM	SHV	TEM	SHV	TEM	SHV	TEM	SHV
-	-	2	-	-	-	-	-

Sonuç olarak; antibiyogram plaklarında GSBL pozitifliği ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji görülen 86 non-fermantatif bakterinin % 53.5’inde (n = 46) tek başına PER-1, % 2.3’ünde (n = 2) tek başına TEM grubu beta-laktamaz, % 13.9’unda da (n = 12) PER-1 ve TEM grubu beta-laktamazlar bir arada saptandı. Söz konusu 86 non-fermantatif suşun 26’sında ise PER-1, TEM veya SHV grubu beta-laktamaz belirlenemedi.

4.9. PER-1 Enziminin Aktarılabirliği

4.9.1. Konjugasyon Deneyleri

bla_{PER-1} geninin aktarılabirliğinin incelenmesi amacıyla, streptomisine dirençli ve laktozu fermente etmeyen *E. coli* K 12 suşunun (J 62-2) kullanıldığı konjugasyon deneyleri gerçekleştirildi. Yedi suşun dışında tüm verici suşların, ampicilin (10µg/ml) + streptomisin (1000µg/ml) ve seftazidim (2µg/ml) + streptomisin (1000µg/ml) içeren seçici plaklarda, streptomisin konsantrasyonu 1500µg/ml’ye yükseltilmesine karşın, transkonjugasyondan önce üredikleri gözlemlendi. Yedi suşla, sıvı ve katı ortamda 35C° ve

37C° sıcaklıklarında yapılan konjugasyon deneyleri sonucunda, seftazidim direncini aktaramadıkları saptandı.

4.9.2. Plazmit İzolasyonu

Her bir ERIC-PZT paterninden birer örnek seçilip, bu suşlarda “Nucleospin-Plasmid” kiti, Birnboim yöntemi (68), Kado-Liu yöntemi (69) ve bu yöntemin Danel ve arkadaşları (50) tarafından uygulanan bir modifikasyonunu kullanarak plazmit ekstraksiyonu yapıldı. İncelenen suşlarda, yukarda sözü edilen yöntemlerden hiçbiriyle plazmit saptanamadı.

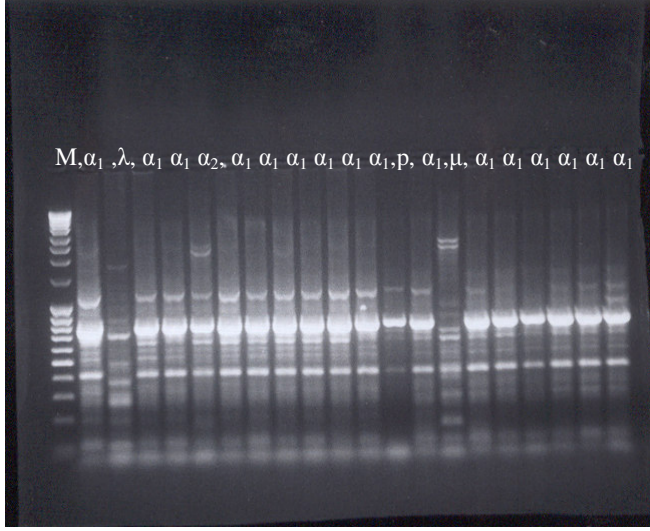
4.9.3. Plazmitten Kurtarma Deneyleri

bla_{PER-1} geninin plazmit üzerinde olup olmadığını ortaya koymak amacıyla, bu geni taşıdığı PZT ile doğrulanmış, her bir ERIC-PZT paterninden seçilen örnek suşlarda plazmit DNA’dan “kurtarma” deneyi gerçekleştirildi. Bu deneylerde, seçilen suşlar, DNA’ya bağlanarak, öncelikli olarak plazmit sentezini inhibe eden etidyum bromür (EB) ile, 0.06-1024 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda muamele edildi. En yüksek EB konsantrasyonunda üreyen suşlarda, *bla_{PER-1}*’e özgü primerlerle PZT uygulandı. İncelenen suşların tümünde *bla_{PER-1}*’in varlığını sürdürdüğü gözlemlendi. Ayrıca, disk difüzyon yöntemiyle belirlenen seftazidim dirençlerinde herhangi bir değişim saptanmadı.

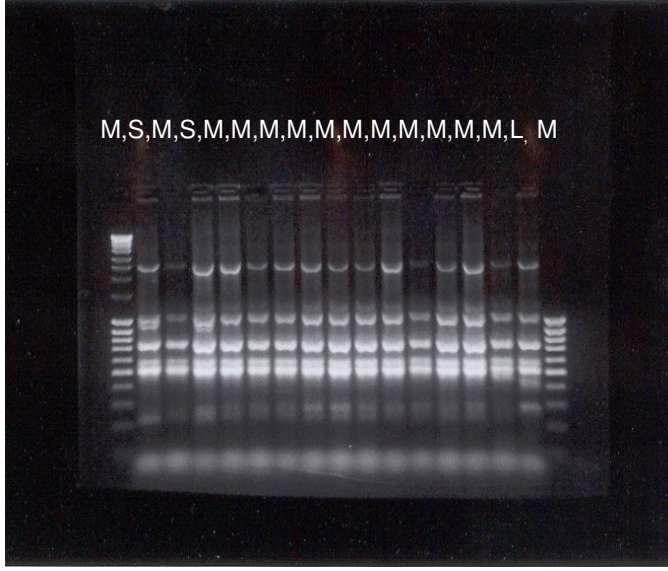
4.10. PER-1 Enzimi Üreten Suşlarda Sınıf-I İntegron Varlığı ve Epidemiyolojik Değeri

bla_{PER-1} saptanan suşlarda, sınıf-1 integronların varlığı ve epidemiyolojik değeri, integronların 5’ ve 3’ korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZT ile araştırıldı. *P. aeruginosa* suşlarında, sayıları dört ile 10, büyüklükleri ise yaklaşık 4000 bp ile 100 bp arasında değişen bantlar oluştu (Şekil-13). *A. baumannii* suşlarında ise sayıları altı ile sekiz, büyüklükleri yaklaşık 2500bp ile 300 bp arasında değişen bantların oluştuğu

gözlendi (Şekil-14). Bu veri, incelenen suşlarda sayı ve büyüklükleri farklılık gösteren birden fazla sınıf-1 integronun bulunduğunu gösteriyordu.



Şekil-13. Bazı *P. aeruginosa* suşlarının integron-PCR paternleri



Şekil-14. Bazı *A. baumannii* suşlarının integron-PCR paternleri

Bant paternleri, ERIC-PZT sonuçlarında da kullanılan kriterlerle değerlendirildiğinde, *bla_{PER-1}* saptanan *P. aeruginosa* suşlarında 12 farklı integron paterninin (α , β , γ , η , π , θ , μ , ϵ , Ω , ρ , ve λ) olduğu gözlemlendi. “ α ” paternine sahip suşlar, 19 (α_1) ve 16 (α_2) üyelik iki alt dala ayrılan en büyük gruptu. “ β ” paterni, kendi içinde alt dallara ayrılan ve beş üyeli, “ θ ” üç, “ γ ” ve “ Ω ” ise ikişer üyeli gruplardı. Diğer paternler (η , π , μ , ϵ , ρ ve λ) tek üyeli temsil ediliyorlardı. *A. baumannii* izolatlarında ise, 14 suşta görülen “K” ve 15 suşta görülen “M” paternlerinin yanı sıra, iki suşta saptanan “S”, birer suşta saptanan “N” ve “L” integron paternleri belirlendi. 98-2000 döneminde izole edilen ve *bla_{PER-1}* saptanan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının ERIC-PZT ve integron-PZT sonuçları Tablo-11’de, 2001 suşlarının sonuçları Tablo-12’de, 2002 suşlarının sonuçları Tablo-13’de ve 2003 suşlarının sonuçları da Tablo-14 ve 15’de bir arada sunulmuştur.

“Y” ERIC-PZT paternine sahip *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* suşlarının % 71.4’ünde “ β ”, “X” ERIC-PZT paternli suşların da % 79.5’inde “ α ” integron paterni saptandı. “Z” ERIC-PZT paterni sergileyen iki *P. aeruginosa* suşunda da “ Ω ”, “W” ERIC-PZT paternli bir suşta ise “ λ ” integron paterni gözlemlendi (Tablo-16). ERIC-PZT ile integron paterni

uyumsuz olan ve tüm bilgilerine ulaşabildiğimiz beş *P. aeruginosa* suşu vardı. Bu suşların izolasyon tarihleri ve izole edildikleri servisler göz önüne alındığında, iki suшта ERIC-PZT'nin, üç suшта da integron paterninin epidemiyolojik verilerle daha uyumlu olduğu gözlemlendi. ERIC-PZT paterni "A" olan bla_{PER-1} (+) *A. baumannii* suşlarının % 73.7'sinde "K", "B" ERIC-PZT paternlilerin de % 84.6'sında "M" integron paterni belirlendi. "C" ERIC-PZT paternine sahip tek *A. baumannii* izolatında ise "L" integron paterni tespit edildi (Tablo-17). ERIC-PZT ile integron paterni uyumsuz olan, kayıtlarına ulaşabildiğimiz altı *A. baumannii* suşu, izolasyon tarihleri ve izole edildikleri servisler dikkate alınarak değerlendirildiğinde; bir tanesinde ERIC-PZT'nin, beşinde de integron paternlerinin epidemiyolojik verilerle daha uyumlu olduğu gözlemlendi.

Tablo-11. 98-2000 döneminde izole edilen bla_{PER-1} (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri

<i>P. aeruginosa</i>				
SUŞ NO	ERIC-PCR	İNTEGRON-PCR	İZOLASYON TARİHİ	İZOLE EDİLDİĞİ SERVİS
1-98	Y ₁	γ	1998	DYB
9-99	Y ₁	β ₄	1999	AYB
20-99	Y ₁	β ₃	1999	AYB
4-98	Y ₂	β ₁	1998	AYB
5-98	Y ₂	β ₁	1998	GKDC
6-98	Y ₂	γ	1998	GKDC
10-99	Y ₂	β ₂	1999	DAH
16-99	X _{1C}	θ	1999	GKDC
23-99	X _{1C}	θ	1999	AYB
27-99	X _{1C}	α ₂	1999	P.CER.
29-99	X _{1A}	α ₂	1999	AYB
30-99	X _{1A}	α ₂	1999	G.CER.
5-00	X _{1A}	θ	2000	G.CER.
16-00	X ₂	η	2000	G.CER.
<i>A. baumannii</i>				
11-99	A	K	1999	NRŞ
12-99	A	K	1999	ORT
14-99	A	K	1999	P.CER.
24-99	A	K	1999	DERM
1-00	A	K	2000	G.CER.
2-00	A	M	2000	DYB
9-00	A	K	2000	AYB

Tablo-12. 2001 yılında izole edilen *bla_{PER-1}* (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri

<i>P. aeruginosa</i>				
SUŞ NO	ERIC-PCR	İNTEGRON-PCR	İZOLASYON TARİHİ	İZOLE EDİLDİĞİ SERVİS
3-01	X _{1A}	α_2	01/02	GÖG
9-01	X _{1A}	α_2	26/01	AYB
20-01	X _{1A}	α_2	28/02	DYB
47-01	X _{1A}	α_2	15/06	NÖR
57-01	X _{1A}	α_2	13/06	NRŞ
58-01	X _{1A}	α_2	11/06	AYB
17-01	X _{1B}	α_2	23/07	AYB
18-01	X _{1B}	α_2	03/09	AYB
19-01	X _{1B}	α_2	19/02	NRŞ
14-01	X _{1C}	α_2	28/05	AYB
56-01	X _{1C}	α_2	11/06	AYB
60-01	X _{1C}	α_2	18/06	AYB
61-01	X _{1C}	α_2	21/06	AYB
<i>A. baumannii</i>				
7-01	A	K	02/09	DYB
21-01	A	K	23/08	AYB
23-01	A	K	06/08	AYB
28-01	A	M	31/01	GÖG
31-01	A	K	29/03	AYB
36-01	A	K	08/02	DYB
37-01	A	K	19/06	DAH
43-01	A	K	28/05	G.CER.

Tablo-13. 2002 yılında izole edilen *bla_{PER-1}* (+) suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri

<i>P. aeruginosa</i>				
SUŞ NO	ERIC-PCR	İNTEGRON-PCR	İZOLASYON TARİHİ	İZOLE EDİLDİĞİ SERVİS
33-02	X _{1A}	α_1	23/10	NRŞ
42-02	X _{1A}	α_1	20/07	PED.CER.
14-02	X _{1B}	α_1	09/04	AYB
4-02	X _{1C}	α_1	30/09	NRŞ
7-02	X _{1C}	ϵ	12/04	AYB
8-02	Z	Ω	22/06	P.CER.
43-02	Z	Ω	16/07	P.CER
<i>A. baumannii</i>				
2-02	A	K	15/10	AYB
17-02	A	N	15/04	DYB
35-02	A	M	28/05	DYB

Tablo-14. 2003 yılında izole edilen *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri

SUŞ NO	ERIC-PCR	İNTEGRON-PCR	İZOLASYON TARİHİ	İZOLE EDİLDİĞİ SERVİS
5-03	X _{1A}	α ₁	19/03	DAH
9-03	X _{1A}	α ₁	18/03	DAH
16-03	X _{1A}	α ₁	03/06	DAH
20-03	X _{1A}	α ₁	08/07	DAH
22-03	X _{1A}	α ₁	09/06	GÖG
24-03	X _{1A}	α ₁	15/05	AYB
25-03	X _{1A}	α ₁	14/04	DAH
31-03	X _{1A}	α ₁	21/07	GÖZ
36-03	X _{1A}	α ₁	06/07	NRŞ
48-03	X _{1A}	α ₁	01/09	AYB
50-03	X _{1A}	α ₁	15/09	AYB
71-03	X _{1A}	ρ	04/08	AYB
79-03	X _{1A}	α ₁	05/11	NRŞ
103-03	X _{1A}	o	25/12	AYB
80-03	X _{1B}	α ₁	24/10	GÖG
38-03	X ₂	μ	24/06	DAH
17-03	X ₂	α ₁	21/05	GÖG
12-03	X ₂	π	12/05	AYB
8-03	X ₂	α ₁	20/03	ORT
7-03	W	λ	25/02	P.CER

Tablo-15. 2003 yılında izole edilen *bla_{PER-1}* (+) *A. baumannii* suşların ERIC-PZT ve İntegron-PZT paternleri

SUŞ NO	ERIC-PCR	İNTEGRON-PCR	İZOLASYON TARİHİ	İZOLE EDİLDİĞİ SERVİS
4-03	B	S	07/03	P.CER.
27-03	B	M	29/07	AYB
28-03	B	S	28/07	AYB
42-03	B	M	14/08	AYB
43-03	B	M	18/08	P.CER
46-03	B	M	12/08	DAH
47-03	B	M	03/09	DYB
49-03	B	M	01/09	AYB
51-03	B	M	16/09	AYB
53-03	B	M	03/09	NRŞ
54-03	B	M	01/09	AYB
59-03	B	M	13/10	AYB
99-03	B	M	22/12	AYB
100-03	A	M	22/12	AYB
108-03	C	L	30/12	JİN

Tablo-16. *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* suşlarında saptanan ERIC-PZT ve integron paternleri

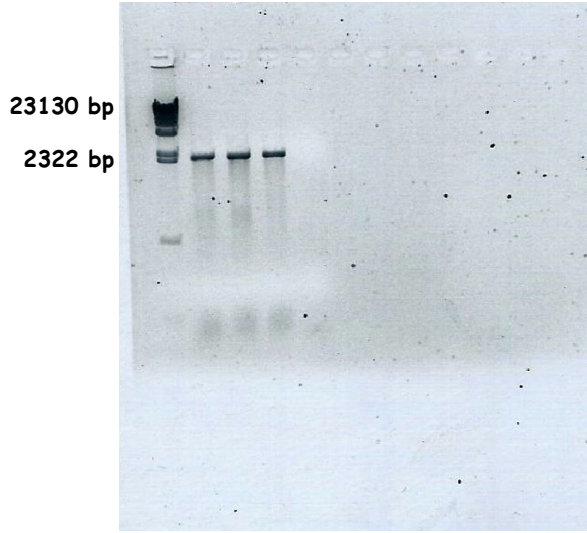
	ERIC-PZT Paterni (suş sayısı)			
	Y (7)	X (44)	Z (2)	W (1)
İntegron Paterni (suş sayısı)	γ (2), β (5),	α (35), θ (3), ρ (1), σ (1), $\acute{\epsilon}$ (1), η (1), π (1), μ (1)	Ω (2)	λ (1)

Tablo-17 *bla_{PER-1}* (+) *A. baumannii* suşlarında saptanan ERIC-PZT ve integron paternleri

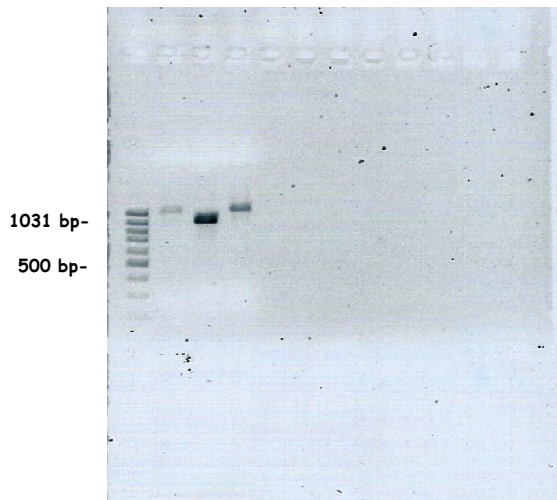
	ERIC-PZT Paterni (suş sayısı)		
	A (19)	B (13)	C (1)
İntegron Paterni (suş sayısı)	K (14), M (4), N (1)	M (11), S (2)	L (1)

4.11. *bla_{PER-1}* Geninin Sınıf-1 İntegronlarla İlişkisi

bla_{PER-1} geninin integron kökenli olup olmadığını ortaya koymak için, bu geni taşıdığı PZT ile doğrulanmış, her ERIC-PZT paterninden seçilen örnek suşlarda, sınıf-1 integronların 5' korunmuş bölgesinde yer alan ve *attI* rekombinasyon bölgesine özgü 5'-CS primeri ile *bla_{PER-1}* genine özgü PER-1B primeri kombine edilerek PZT uygulandı: İncelenen *A. baumannii* suşlarında herhangi bir ürün oluşmazken, üç *P. aeruginosa* suşunda yaklaşık 2300 bp'lik bir ürün oluştu (Şekil-15). Bu ürünlerin *bla_{PER-1}* genine ait dizileri içerip-içermediğini anlamak üzere, 2300 bp'lik ürün kalıp olarak kullanılarak PER1A ve PER-1B primerleriyle PZT gerçekleştirildi. Bir suшта *bla_{PER-1}* için tipik yaklaşık 900 bp'lik ürünün, diğer ikisinde de yaklaşık 1000 bp'lik ürünlerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil-16) Elde edilen PZT ürünlerine ait dizi analizi verilerinin "blastn" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) programında incelenmesi sonucu, yaklaşık 900 bp'lik ürünün *bla_{PER-1}* genine ait olduğu saptandı.



Şekil-15. Sınıf-1 integronların korunmuş bölgesi ve *blaPER-1*'e özgü primerlerin kombine edilmesiyle üç *P. aeruginosa* suşunda elde edilen PZT ürünleri



Şekil-16. 2300 bp'lik ürünlerin kalıp olarak kullanıldığı standart PER-PZT sonuçları

5. TARTIŞMA

TEM veya SHV grubu bir GSBL olmayan PER-1 enzimi, ilk kez 1991 yılında Fransa’da bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (21). 1991-1993 yılları arasında Ankara’da seftazidim dirençli 14 *P. aeruginosa* suşunda da PER-1 enzime rastlanmış, ardından ülke çapında gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada söz konusu enzimin *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır (47, 50). PER-1 enziminin sadece Türkiye ile ilişkili olabileceği düşünülürken, 2000 yılından itibaren Avrupa’daki birçok merkezden ve Kore’den PER-1 sentezleyen suşlar bildirilmiştir (46, 54, 73). Oksiminino sefalosporinlere karşı etkinliğinin yüksek olması ve çeşitli patojen bakteriler arasında yayılma yeteneği, PER-1’in klinik önemini arttıran özellikler olarak ortaya çıkmaktadır (21). *bla_{PER-1}* günümüze kadar, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* başta olmak üzere *Alcaligenes faecalis* ve birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde saptanmıştır (47, 49, 56, 57). PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının, hastalardaki ağır klinik tabloyla ilişkili oldukları da gösterilmiştir (74).

Hastanemizde izole edilen seftazidime dirençli çeşitli Gram-negatif bakteriler arasında PER-1 enziminin moleküler-epidemiolojik özelliklerini araştırmayı hedeflediğimiz çalışmamızda, antibiyogram plaklarında seftazidim direncinin yanı sıra piperasilin (PRL), aztreonam (ATM), sefotaksim (CTX), imipenem (IPM), sefepim (FEP) antibiyotiklerine direnç ve GSBL üretimi gibi özellikler de incelenmiştir. Genel olarak, seftazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının diğer β -laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu, incelenen ajanlar içinde en etkilisinin imipenem olduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamındaki yıllar içinde, direnç oranlarında küçük dalgalanmalar olmasına karşın β -laktam antibiyotiklere yüksek direncin devam ettiği gözlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* dışında, *E.coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında da PRL, CTX ve ATM’ye yüksek direnç oranları saptanırken, *S. maltophilia* suşları dışında IPM direncine rastlanmamıştır. Özellikle *E.coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında gözlenen FEP direnç oranlarının yıllar içinde artan bir ivme gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, çalışma kapsamında toplanan *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olmalarının işaret ettiği gibi,

çoğunlukla GSBL-pozitif olmaları nedeniyle FEP'e – antibiyogram sonucundan bağımsız olarak – dirençli kabul edilmeleri gerekmektedir. Bunun yanı sıra, FEP'in klinik kullanımının artmasının sonucu olarak, bu antibiyotiği daha etkin biçimde parçalayan beta-laktamazların *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında yaygınlaştığı da düşünülebilir.

Ülkemizde hastane kökenli Gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının incelendiği, çok merkezli iki çalışma bulunmaktadır (9). Bu çalışmalardan biri olan Mystic-2003 sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direnç oranı % 40.5, *A. baumannii* suşlarında ise % 89.3 olarak bulunmuştur. Altı farklı merkezin katıldığı Hitit-2004 çalışmasında ise, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarındaki seftazidim direnç oranları sırasıyla; % 25 ve % 83 olarak saptanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde, sözü edilen türlerdeki seftazidim direnç oranlarının, çok merkezli çalışmalarda belirtilen değerlerin altında olduğu gözlenmektedir. 2002, 2003 ve 2004 yıllarında üniversitemiz hastanesinde izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının seftazidim direnç oranları, sırasıyla; % 21.3, % 23.7 ve % 16.2'dir. 2002, 2003 ve 2004 yıllarında üniversitemiz hastanesinde izole edilen *Acinetobacter* türlerinin seftazidim direnç oranları ise, sırasıyla; % 56.4, % 60.3 ve % 75.5 olarak saptanmıştır.

Türkiye genelinde PER-1 enzim prevalansını ortaya koymayı hedefleyen bir çalışmada, farklı bölgelerdeki yedi üniversite hastanesinin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında IPM, FEP ve ATM antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; % 60.9, % 91.3 ve % 98.9 olarak bulunmuştur (75). Bu değerler, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden daha düşük olmakla birlikte, Türkiye'de seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'ların diğer β -laktam antibiyotiklere de önemli oranda dirençli olduğunu göstermektedir. Ayrıca sözkonusu suşların siprofloksasin, gentamisin ve amikasin gibi antibiyotiklere de dirençli olduğu belirtilmektedir. Aynı çalışma kapsamında toplanmış *Acinetobacter spp.* suşlarının IPM, FEP ve ATM'ye direnç oranları sırasıyla; % 26.2, % 73.8 ve % 100 olarak saptanmış, siprofloksasin, gentamisin ve amikasin gibi antibiyotiklere de yüksek direnç oranları bildirilmiştir. Bu rakamlar, seftazidim dirençli *Acinetobacter spp.* suşlarının da diğer β -

laktam ajanlar ve farklı grup antibiyotiklere büyük oranda dirençli olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda incelenen *A. baumannii* suşlarının IPM ve FEP direnç oranları bu değerlerden yüksek olup, benzer bir durumun hastanemiz için de geçerli olduğunu göstermektedir. İstanbul Tıp Fakültesi hastanesinin yoğun bakım ünitesinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarında bildirilen IPM (% 98), ATM (% 92), FEP (% 96) ve PRL (% 41) direnç oranlarından özellikle IPM direncinin yüksekliği dikkat çekmektedir (59). Söz konusu çalışmada elde edilen PRL direnç oranı, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz orana göre (% 95.7) oldukça düşüktür.

Çalışmamızda, PZT yöntemi ile *bla_{PER-1}* geni taşıdığı saptanan suşlardan hiçbirinde seftazidim MİK değerinin 256 µg/ml'nin altında olmaması, PER-1 enziminin seftazidime karşı yüksek etkinliğini ortaya koymaktadır. PZT ile *bla_{PER-1}* saptanan ve saptanmayan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarımızın çeşitli β-laktam antibiyotiklere karşı disk difüzyon yöntemiyle belirlenen direnç oranları karşılaştırıldığında, IPM direnci hariç, arada önemli bir farkın olmadığı, saptanmıştır. Vahaboğlu ve arkadaşlarının 1996 yılında gerçekleştirdikleri ve Türkiye'nin farklı bölgelerindeki hastanelerde PER-1 prevalansını araştırdıkları çok merkezli çalışmada, PER-1 üreten suşların çoğunlukla imipenem ve meropeneme duyarlı oldukları belirtilmektedir (47). İtalya'da bir yoğun bakım ünitesinde salgına neden olan *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* suşlarına bağlı olarak gelişen infeksiyonların da IPM ile tedaviye olumlu yanıt verdikleri bildirilmiştir (46). Türkiye'de son yıllarda gerçekleştirilen bir diğer çok merkezli çalışmada, üçüncü kuşak sefalosporin, karbapenem, aminoglikozit ve kinolon grubu antibiyotikler kullanılarak belirlenen çoklu antibiyotik direnç fenotipi açısından *bla_{PER-1}* (-) ve *bla_{PER-1}* (+) suşlar arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (75). Buna karşın, PER-1 üreten suşların, üretmeyenlere oranla daha dirençli olduklarını gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin; bir İtalyan hastanesinde salgına yol açan *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* suşlarının piperasilin, geniş spektrumlu ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamların yanı sıra aminoglikozit ve florokinolonlara dirençli olduğu saptanmış, ancak non-epidemik *bla_{PER-1}* (-) izolatların genelde geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı oldukları ve antibiyogramlarında GSBL paterni göstermedikleri bildirilmiştir (46). Kore'de gerçekleştirilen bir araştırmada da, PER-1 enzimi üreten *Acinetobacter spp.* suşlarının CAZ'ın yanı sıra FEP, CTX ve ATM'ye

dirençli oldukları, fakat PER-1 üretmeyen suşlarda, sayılan bu antibiyotiklere ve ampisilin-sulbaktama direnç oranlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (54).

Çalışmamıza alınan suşlarda, CAZ, CTX, ATM ve FEP diskleri ile amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski 20 mm arayla yerleştirilerek GSBL varlığı taranmış, zon çaplarının sinerji görülemeyecek kadar dar olması durumunda aradaki mesafe 15 mm olacak şekilde test tekrarlanmıştır. Bu şekilde, PZT yöntemiyle *bla_{PER-1}* geni saptanan 54 *P. aeruginosa* suşundan 45'inde (% 83.3) ve 33 *A. baumannii* suşundan sadece dokuzunda (% 27.3) GSBL varlığı belirlenebilmiştir. İstanbul Tıp Fakültesi hastanesinin yoğun bakım ünitesinden izole edilen CAZ dirençli *P. aeruginosa* suşlarında, “British Society for Antimicrobial Chemotherapy” önerileri doğrultusunda, CAZ, ATM ve tikarsilin-klavulanik asit (75 µg + 10 µg) diskleri kullanılarak ve aradaki mesafe 25-30 mm olacak şekilde gerçekleştirilen çift disk sinerji testiyle, 42 *bla_{PER-1}* (+) izolattan 18'inde (% 42.9) GSBL varlığı saptanabilmiştir (59). Kore'de gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da, PZT yöntemiyle *bla_{PER-1}* varlığı tespit edilen 53 *Acinetobacter spp.* suşundan 17'si, çift disk sinerji tekniğiyle GSBL-(+) olarak değerlendirilmiştir (54). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar da, PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının saptanmasında çift disk sinerji yönteminin güvenilir olmadığı yönündeki bulguları desteklemektedir.

Bazı yayınlarda *bla_{PER-1}* ve/veya *bla_{GES}* enzimlerini üreten *P. aeruginosa* suşlarının antibiyogramlarında IPM ve CAZ diskleri arasında sinerji görülebileceği belirtildiğinden, çalışmaya alınan suşlar bu açıdan da değerlendirilmiştir (21, 58). PZT yöntemiyle *bla_{PER-1}* geni saptanan 54 *P. aeruginosa* suşundan sadece 10'unda (% 18.5) IPM ile CAZ diskleri arasında sinerji saptanırken, 33 *bla_{PER-1}* (+) *A. baumannii* suşundan hiçbirinde sözü edilen sinerjiye rastlanmamıştır. Özellikle *P. aeruginosa* suşlarında, dış membran geçirgenliğinde azalma ve aktif pompa sistemleri gibi mekanizmaların imipenem direncinde rol oynaması ve imipenemin kromozomal Amp-C enzimlerini indüklemesi, IPM ve CAZ diskleri arasında sinerji oluşumunu engelleyen faktörler olabilir. İmipenemin kromozomal sefalosporinazları indükleyici etkisini ortadan kaldırmak için, sinerji testinin oksasilin içeren plaklarda yapılması önerilse de, rutin uygulama için pratik değildir (58). Bu açıdan, PER-1 sentezleyen *P. aeruginosa* ve

A. baumannii izolatlarının antibiyogramlarında her zaman IPM ve CAZ diskleri arasında sinerji görülemeyeceği dikkate alınmalıdır.

bla_{PER-1} genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZT sonucu hastanemizde izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının % 46.2'sinin ve *A. baumannii* suşlarının % 35.9'unun bu geni taşıdığı saptanmıştır. 1996 yılında gerçekleştirilen ve Türkiye'de yedi farklı şehirdeki sekiz üniversite hastanesinden izole edilen suşlarda PER-1 prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarının % 11'inin ve *Acinetobacter spp.*'lerin de % 46'sının PER-1 enzimi ürettiği saptanmıştır (47). Ancak sadece seftazidim dirençli suşlar dikkate alındığında bu oranlar *P. aeruginosa* suşlarında % 38.5'e, *Acinetobacter spp.* suşlarında ise % 60'a çıkmaktadır. 2005 Yılında yayımlanan, Türkiye'deki yedi üniversite hastanesinin yoğun bakım ünitelerinden elde edilen seftazidim dirençli suşlardaki PER-1 enzim prevalansının incelendiği daha güncel bir çok merkezli çalışmada, *bla_{PER-1}(+)* *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* oranları sırasıyla % 55.4 ve % 31 olarak bulunmuştur (75). 1996'daki çalışmaya göre *bla_{PER-1}* geni saptanan *Acinetobacter spp.* suşlarının oranında anlamlı bir düşüş görülmekle birlikte ($p<0.05$), *P. aeruginosa* suşlarına ait oranlar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu iki çok merkezli çalışmada *bla_{PER-1}* geninin saptanmasında farklı moleküler tekniklerin kullanılması ve ikinci çalışmada sadece yoğun bakım kaynaklı suşların seçilmesi gibi noktalar, sonuçlar değerlendirilirken göz önünde tutulmalıdır. Ayrıca, çalışmalara katılan merkezlere ait PER-1 üretim oranları ve her iki çalışmada da aynı merkezlerin yer alıp almadığı konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. İstanbul Üniversitesinde gerçekleştirilen bir çalışmada, yoğun bakım ünitesinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının % 86'sında (42/49) *bla_{PER-1}* geni tespit edilmiştir (59). Bu oran, günümüze kadar seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında saptanmış en yüksek PER-1 üretim oranıdır. İncelenen suş sayısının kısıtlı oluşu, *bla_{PER-1}(+)* suşların % 60'ının iki farklı klonun üyesi oluşu ve sadece yoğun bakım kaynaklı izolatların incelenmesi gibi nedenlerin bu yüksek oranın elde edilmesine yol açtığı düşünülebilir. Bizim çalışmamızda saptanan PER-1 üretim oranları, sözü edilen çok merkezli çalışmalardaki oranlardan çok farklı olmayıp, hastanemizde, Türkiye genelinde olduğu gibi, *bla_{PER-1}* geninin özellikle *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarında yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen suşların izole edildikleri dönemler olan 98-2000, 2001, 2002 ve 2003 yıllarındaki PER-1 üretim oranları sırasıyla; % 32.3, % 33.9, % 14.9 ve % 37.9 olarak belirlenmiştir. 2002 yılındaki azalma dışında, PER-1 üreten mikroorganizmaların oranında önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmektedir. 2002 yılındaki oranın düşük oluşu, antibiyotik kullanım politikalarındaki bir değişikliğin veya hastane infeksiyonu kontrol önlemlerinin bir sonucu olabilir.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları dışında, bir idrar örneğinden soyutlanan, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli bir *Alcaligenes faecalis* izolatında da *bla_{PER-1}* geni saptanmıştır. 2000 Yılında, İtalya'da izole edilen bir *A. faecalis* suşunun da PER-1 ürettiği bildirilmiş, daha sonra yapılan incelemelerde ilgili genin 44 kb'lık non-konjugatif bir plazmit üzerinde bulunduğu ve Tn3 ailesinden transpozon benzeri bir yapıyla ilişkili olduğu anlaşılmıştır (49, 76). Çalışmamızda *bla_{PER-1}* saptanan *A. faecalis* suşuyla yapılan konjugasyon deneyleri olumsuz sonuç vermiştir. PER-1 enziminin, *A. faecalis* gibi klinik örneklerden nadiren izole edilen ve normal insan mikrobiotasının bir üyesi de olabilen mikroorganizmalarda saptanması, diğer fırsatçı patojenlerde de ortaya çıkma olasılığını gündeme getirmektedir. Bu veriler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında artık daha geniş bir yelpazede PER-1 üreten bakterilere rastlanabileceğini göstermektedir.

Türkiye dışında Fransa, İtalya, Belçika ve Kore gibi ülkelerden de PER-1 üreten *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus mirabilis* ve *Alcaligenes faecalis* suşları bildirilmiştir (46, 49, 54, 56, 73, 77). Ancak bu ülkelerde PER-1 enziminin genel prevalansını ortaya koyan çok merkezli çalışmalara rastlamak güçtür. 2001-2002 yılları arasında orta Fransa'da dokuz hastanenin katılımıyla gerçekleştirilen çalışma kapsamında toplanan 5304 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatından 37'sinde (% 0.7) *bla_{PER-1}* varlığı tespit edilmiştir (78). Moleküler tiplendirme çalışmaları sonucu, çeşitli merkezlerde salgınlara neden olmuş bu suşlardan çoğunun aynı ya da benzer genotipik profile sahip oldukları ortaya çıkmıştır. 1995-2000 yılları arasında Kuzey İtalya'daki altı hastanede izole edilen, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli, çift disk sinerji testiyle GSBL-pozitifliği saptanmış ve nozokomiyal salgın etkeni 44 *P. aeruginosa* suşundan 20 tanesinin PER-1 ürettiği

belirlenmiştir (51). Güney Kore’de bir hastanede, 61 seftazidim dirençli *Acinetobacter spp.* suşundan 53’ünde (% 86.9) *bla_{PER-1}* varlığı saptanırken, 101 *P. aeruginosa* suşundan hiçbirinde sözü edilen gene rastlanmamıştır (54). PER-1 varlığı saptanan ülkelerde sorunun gerçek boyutlarını anlamaya yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu enzimin en sık rastlandığı ülke konumundaki Türkiye’nin komşularında PER-1’in görülme sıklığı hakkında hiçbir bilgi olmaması dikkat çekicidir.

Hastanemizde *bla_{PER-1}* varlığı saptanan *P. aeruginosa* suşlarının büyük çoğunluğunun ERIC-PZT yöntemiyle, başlıca iki klonun üyesi oldukları anlaşılmıştır. X (n:44) ve Y (n:7) adlı iki ana klonun yanı sıra birkaç suşun yer aldığı Z (n:2) ve W (n:1) klonları da gözlenmiştir. *bla_{PER-1}* (+) *A. baumannii* suşlarının da aynı yöntemle, tek bantlık farklılık gösteren A (n:19) ve B (n:13) klonlarına ayrıldıkları saptanmıştır. Sadece bir *A. baumannii* suşunun diğerlerinden farklı bir patern (C) sergilediği belirlenmiştir. Bu veriler, hastanemizde PER-1 enzim prevalansının yüksek oluşundan büyük ölçüde, klonal yayılım gösteren *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır. İstanbul Üniversitesi Hastanesinde, *bla_{PER-1}*(+) 42 *P. aeruginosa* suşunun klonal yakınlığının ERIC-PZT ile araştırıldığı bir çalışmada 16 farklı bant paterni saptanmıştır (59). Bu suşlardan 25’inin (% 60) iki farklı paternin üyesi olduğu anlaşılmış ve hastalar arasında klonal olarak ilişkili suşların yayıldığı sonucuna varılmıştır. Bir başka çalışmada ise, Türkiye’de farklı bölgelerdeki yedi hastaneden birer *bla_{PER-1}*(+) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşu rastgele seçilmiş ve ERIC-PZT ile klonal yakınlıklarının incelenmesi sonucu *bla_{PER-1}*’in multi-klonal bir yayılım gösterdiği belirlenmiştir (75). 1997’de Türkiye’de gerçekleştirilen çok merkezli bir diğer çalışmada ise, PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarının klonal yakınlığı “ribozomal DNA fingerprinting” ile değerlendirilmiştir (47). *Acinetobacter spp.* izolatlarında birbirinden farklı iki, *P. aeruginosa* izolatlarında ise üç patern saptanmış, farklı hastanelerde aynı paterne sahip suşlar olduğu saptanmıştır. Ancak bu çalışmada hastaların merkezler arasında transferinin söz konusu olup olmadığı araştırılmamıştır. Yurt dışında yapılan çalışmalarda PER-1 üreten suşların tiplendirilmesinde ERIC-PZT’nin yanı sıra “Pulsed Field Gel Electrophoresis”-PFGE tekniğinin de kullanıldığı gözlenmektedir. İtalya’da farklı merkezlerde salgınlara neden olan *bla_{PER-1}*(+) dokuz *P. aeruginosa* suşunun genetik yakınlığı PFGE yöntemiyle

incelenmiştir (51). Dokuz suştan ikisi aynı paterne sahipken diğerlerinin farklı klonlara ait oldukları anlaşılmış ve genellikle farklı salgınların farklı klonlarca oluşturulduğu sonucuna varılmıştır. Kore’de PER-1 üreten *Acinetobacter spp.* suşlarının klonal yakınlıkları yine aynı teknikle araştırılmış, özellikle yoğun bakım ünitelerinden izole edilen suşların klonal bir yayılım gösterdiği saptanmıştır (54). İtalya’da bir hastanenin yoğun bakım ünitesinde salgına yol açmış *bla_{PER-1}(+)* *P. aeruginosa* suşlarının PFGE yöntemiyle klonal kaynaklı olduğu ve daha önce aynı hastanede sporadik olarak izole edilen *bla_{PER-1}(+)* *P. aeruginosa*’larla benzerlik göstermedikleri belirlenmiştir (46). Ancak epidemik suşlarda ERIC-PZT yöntemiyle iki farklı bant paterni olduğu gözlenmiş, bunlardan birinin daha çok salgının başlangıç döneminde izole edilen suşlarda, diğerinin ise salgının sona ermesine yakın izole edilen suşlarda ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu veriler, ERIC-PZT yöntemiyle daha ayrıntılı bir tipleme yapılabildiğine işaret etmektedir. Hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}(+)* *P. aeruginosa* suşlarında saptanan iki ana paternden biri (Y) sadece 98-2000 döneminde görülmekte sonraki yıllarda ağırlıklı olarak diğer ana paterne (X) ve alt tiplerine dahil suşların hakimiyeti gözlenmektedir. PER-1 üreten *A. baumannii* suşlarında da 2003 yılına kadar sadece “A” paternine rastlanırken, 2003 yılında izole edilen suşların büyük çoğunluğunu A’dan bir bantlık farklılık gösteren “B” paternine sahip suşlar oluşturmaktadır.

PER-1 enzimiyle % 86 oranında benzerlik gösteren PER-2, günümüze kadar sadece Güney Amerika ülkelerinde izole edilen ve büyük çoğunluğunu *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu suşlarda saptanmıştır (23, 79, 80). İtalya’da gerçekleştirilen bir çalışmada, *bla_{PER-1}* geninin *Stu-I* enzimiyle, *bla_{PER-2}* nin de *Pvu-II* ile kesilememesi ilkesinden yararlanılarak, bu iki enzimin restriksiyon analiziyle ayırt edilebileceği gösterilmiştir (46). Hastanemizde izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının farklı ERIC-PZT paternlerine sahip temsilcilerine ait *bla_{PER-1}-PZT* ürünleriyle, söz konusu enzimler kullanılarak restriksiyon analizi yapılmıştır. İncelenen tüm PZT ürünlerinin *Pvu-II* ile dört parçaya bölünmesi, *Stu-I* enzimiyle ise hiçbir değişime uğramaması, ürünlerin *bla_{PER-1}*’e ait olduğunu göstermiş, PZT ürünlerinde, daha sonra gerçekleştirilen DNA dizi analizinin sonuçları da restriksiyon analizi sonuçlarını

doğrulamıştır. PER-1 / PER-2 ayırımının restriksiyon analiziyle yapılmasının, DNA dizi analizine göre daha ucuz ve pratik olması gibi avantajları bulunmaktadır.

PZT yöntemiyle elde edilen sonuçları doğrulamak ve hastanemizdeki suşlarda farklı bir PER türevinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla, farklı ERIC-PZT paternlerine sahip *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının PER-PZT ürünlerinde çift yönlü olarak DNA dizi analizi uygulanmıştır. Elde edilen nükleotid dizilerinin “Blastn” programıyla incelenmesi sonucu, ilk saptanan *bla_{PER-1}* dizisiyle ve daha sonra veri bankasına girilmiş *bla_{PER-1}* dizileriyle %99-100 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir (45, 51, 52). Nükleotid dizilerinin karşılık geldiği proteinlerin de PER-1 enzimiyle % 99-100 uyumlu olduğu ve aktif bölgelerinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda *bla_{PER-1}* saptanan tek *A. faecalis* suşuna ait PER-PZT ürününün de, hem aynı türde hem de diğer türlerde saptanan PER-1 enzimi dizileriyle tamamen aynı olduğu görülmüştür (49). PER-1 enziminin yapısının, coğrafi olarak farklı bölgelerde izole edilmiş, gerek aynı türün bireyleri gerekse farklı türler arasında değişiklik göstermediği anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda, *bla_{PER-1}* saptanan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının, farklı ERIC-PZT paternlerini temsil eden üyelerinde İEO tekniği ile de PER-1 varlığı araştırılmıştır. İncelenen tüm suşlarda, TEM-1 kontrol (pI: 5.4) bandının biraz altında, PER-1 kontrolüyle (pI: 5.3) aynı hizada bant oluştuğu gözlenmiştir. Bazı *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, PER-1 enzime ait bandın yanı sıra, SHV-2 enzim kontrolüne (pI: 7.6) yakın ve/veya biraz üstünde bantlar oluştuğu saptanmıştır. Bu suşlarda, SHV enzim grubuna özgü primerlerle yapılan PZT sonucu herhangi bir ürün oluşmaması, söz konusu bantların Amp-C tipi veya OXA grubu enzimlere ait olabileceğini düşündürmüştür (50, 81). İEO tekniği ile bir izolatın içerdiği tüm beta-laktamazları aynı anda saptamak teorik olarak mümkünse de, PER-1 ve TEM-1 gibi izoelektrik noktaları birbirine yakın olan enzimlerin ayırt edilmesinde zorluk yaşanabilmektedir. Bu açıdan İEO'nun beta-laktamaz tanımlanmasında tek başına kullanılmaması tavsiye edilmektedir (58).

Antibiogram plaklarında GSBL pozitifliği ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji görülen 86 *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunda PZT yöntemi ile TEM ve SHV grubu enzimlerin araştırılması sonucu; 14 suşta (% 16.3) TEM grubu enzim saptanırken, hiçbirinde SHV grubu enzime rastlanmamıştır. Bu 14 suşun 12'sinde (sekiz *A. baumannii* ve dört *P. aeruginosa*) aynı zamanda PER-1 enzimi de belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında daha önce de TEM grubu enzimler saptanmış olsa da, PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında aynı zamanda TEM-türevi enzimlerin de bulunması, bilinen kadarıyla, bu iki tür için yeni bir durum oluşturmaktadır (58, 81, 82, 83).

Antibiogram plaklarında GSBL pozitifliği ve/veya imipenem ve seftazidim diskleri arasında sinerji gözlenen, ancak PZT yöntemiyle PER-1, TEM veya SHV grubu enzim saptanmayan, 26 non-fermentatif bakterinin (23 *P. aeruginosa* ve üç *A. baumannii*) bir kısmında İEO yöntemiyle beta-laktamazlar araştırılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarından ikisinde TEM kontrolüne daha yakın olmak üzere, TEM-1 (pI: 5.4) ve SHV-2 (pI: 7.6) kontrolleri arasında bant oluşması, daha önce aynı türün üyelerinde saptanan ve klavulanik asitle inhibe olabilen GES (pI_{GES-1}: 5.8), IBC (pI_{IBC-1}: 6.9) veya VEB (pI_{VEB-1}: 7.4) gibi enzimlerin varlığını düşündürmektedir (24, 58). Bu enzimler PER ile birlikte A sınıfı GSBL'lerin, TEM ve SHV türevi olmayan, ayrı bir grubunu oluşturmaktadır (20, 58). *P. aeruginosa*'da OXA tipi GSBL'lere sık rastlansa da, OXA-18 (pI: 5.5) dışındakiler klavulanik asit ile çok az inhibe olmaktadır (20). İncelenen *A. baumannii* suşlarında ise belirli bir noktada lokalize olmaksızın tüm jel boyunca uzanan bantlar gözlenmiştir. Bu türde, kromozomal sefalosporinazların yanı sıra, sıklıkla metallo-beta-laktamazlar ve karbapenemaz niteliğindeki OXA türevi enzimlere rastlanmakla birlikte, klavulanik asitle inhibe olabilen GSBL'lerden PER-1 ve VEB-1 bildirilmiştir (4, 77). Acinetobacter türlerinde plazmit veya integronla ilişkili birçok direnç geninin saptanması, diğer Gram-negatif türlerde yaygın olan bazı GSBL genlerinin de bu yolla geçiş yapabileceği olasılığını gündeme getirmektedir (35, 82, 84). Söz konusu suşlarda, İEO sonuçlarına göre, GSBL paterninden sorumlu olduğu düşünülen enzim veya enzimleri saptamak için PZT ve dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin kullanılacağı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hastanemizde izole edilen suşlarda, *bla_{PER-1}*'in genetik yerleşimini ve aktarılabirliğini incelemek amacıyla, konjugasyon deneyi ve plazmit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Alıcı suş olarak *E. coli* K12 suşunun kullanıldığı konjugasyon deneylerinde, incelenen yedi suşta da *bla_{PER-1}*'in aktarılamadığı gözlenmiştir. Alıcı suş ile verici suşların farklı türden olmasının, aktarılan direnç geninin ekspresyonunda sorun yaratabilmesi veya genin non-konjugatif bir plazmit üzerinde bulunması, konjugasyon deneylerinin olumsuzluğunu açıklayabilecek nedenler olabilir (47, 76). Bazı çalışmalarda, bu tür olumsuzlukları azaltmak amacıyla, alıcı suşlar PER-1 üreten verici suşlar ile aynı türden seçilmiş ancak aktarım gerçekleşmemiştir (4, 46). Bazı *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *A. baumannii* ve *A. faecalis* izolatlarında *bla_{PER-1}*'in plazmit üzerinde olduğu gösterildiğinden (50, 52, 76), hastanemizde izole edilen ve farklı ERIC-PZT paternlerinden seçilen *bla_{PER-1}(+)* suşlarda, Danel ve arkadaşlarının kullandığı yöntem, “Nucleospin-Plasmid” kiti, Birnboim ve Kado-Liu yöntemleriyle plazmit izolasyonu yapılmış, ancak bu yöntemlerden hiçbirisiyle plazmit saptanamamıştır. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilen plazmit ekstraksiyonlarından birçok çalışmada da sonuç alınamaması, bu türlerde plazmit izolasyonunun güç olduğunu ortaya koymaktadır (4, 46, 47, 85). Plazmit izolasyonunun başarısız olması üzerine, *bla_{PER-1}*'in plazmit üzerinde olup olmadığını anlamak amacıyla, bu geni taşıdığı PZT ile belirlenmiş, farklı ERIC-PZT paternlerine sahip suşlarda, etidyum bromür (EB) ile plazmit DNA'dan “kurtarma” deneyi gerçekleştirilmiştir. En yüksek EB konsantrasyonu varlığında üreyen suşlarda, *bla_{PER-1}*'e özgü primerlerle PZT uygulanması sonucu, suşların tümünde *bla_{PER-1}*'in varlığını sürdürdüğü gözlenmiştir. Bu veriler, incelenen izolatlarda PER-1 geninin plazmitlerce kodlanmadığını göstermektedir. PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarıyla gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, *bla_{PER-1}*'in kromozomal kaynaklı olduğu gösterilmiştir (21, 46, 52). Kesin olarak ispatlanmış olmasa da, “plazmitten kurtarma” deney sonuçları, çalışmamızda incelenen suşlarda *bla_{PER-1}*'in kromozom üzerinde olduğuna işaret etmektedir.

Antimikrobiyal direnç genlerinin yayılımında önemli rol oynayan sınıf-1 integronların, hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}* (+) suşlardaki, varlığı ve epidemiyolojik değeri, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerler kullanılarak, PZT ile

araştırılmıştır. İncelenen *P. aeruginosa* suşlarında, sayıları dört ile 10, büyüklükleri, yaklaşık 4000 bp ile 100 bp arasında değişen, *A. baumannii* suşlarında ise sayıları altı ile sekiz, büyüklükleri yaklaşık 2500bp ile 300 bp arasında değişen bantların olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgeleri arasında kalan değişken bölgenin büyüklüğünün *P. aeruginosa* suşlarında 800 bp-3 kb, *A. baumannii* suşlarında ise 550 bp-3 kb arasında olduğu belirlenmiştir (43, 44, 86, 87, 88). Ayrıca, farklı türlerde, hiçbir gen kaseti içermeyen, sadece korunmuş bölgelerden ibaret "boş integronlar" olabildiği gibi (43), dokuz farklı gen kaseti içerebilen ve büyüklükleri 12-13 kp.'yi bulan integronlar da bildirilmiştir (38).

Çeşitli çalışmalarda, aynı genotipe sahip suşlarda farklı integronlar saptandığı gibi, farklı genotiplere sahip, ilişkisiz suşlarda da aynı integrona rastlanmıştır (86, 87, 88). Epidemiyolojik çalışmalarda hem genotip hem de integron içeriği hakkında bilgi sahibi olmanın yararlı olacağı belirtilmiştir (87). Ayrıca bir çalışmada, epidemiyolojik olarak ilişkili suşların tanımlanmasında integron içeriği ve ribotiplemeyle elde edilen verilerin uyumlu olduğu bildirilmiştir (71). Bu bilgiler ışığında, hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}*-pozitif suşlarda, integronların 5' ve 3' korunmuş bölgelerine özgü primerlerle elde edilen PZT sonuçlarıyla ERIC-PZT sonuçları karşılaştırılmıştır. Ayrıntılı epidemiyolojik bilgilerine ulaşabildiğimiz 40 *bla_{PER-1}*-pozitif *P. aeruginosa* suşunun % 87.5'inde (n = 35) ve 26 *A. baumannii* suşunun % 76.9'unda (n = 20) ERIC-PZT paterni ile integron paterninin uyumlu olduğu belirlenmiştir. ERIC-PZT ile integron paterni uyumsuz olan ve tüm bilgilerine ulaşabildiğimiz beş *P. aeruginosa* suşunun izolasyon tarihleri ve izole edildikleri servisler göz önüne alındığında, ikisinde ERIC-PZT'nin, üçünde ise integron paterninin epidemiyolojik verilerle daha uyumlu olduğu gözlenmiştir. ERIC-PZT ile integron paterni uyumsuz olan altı *A. baumannii* suşu, izolasyon tarihleri ve izole edildikleri servisler dikkate alınarak değerlendirildiğinde ise; bir tanesinde ERIC-PZT'nin, beşinde de integron paternlerinin epidemiyolojik verilerle daha uyumlu olduğu belirlenmiştir.

İntegronlarca 40'dan fazla direnç geninin kodlandığı ve bu genlerin; aminoglikozitler, beta-laktam ajanlar, kloramfenikol, makrolidler, sulfonamidler, antiseptik ve dezenfektanlar gibi çeşitli ajanlara direnç gelişiminden sorumlu olduğu bilinmektedir

(35). PER-1 gibi, TEM veya SHV türevi olmayan GSBL'ler grubunda yer alan VEB, GES ve IBC gibi enzimlerin sınıf-1 integronların içeriğinde yer alan genlerce kodlandığı gösterilmiştir (4, 39, 89). PER-1 üreten çeşitli suşlarda daha önce gerçekleştirilen araştırmalar, *bla_{PER-1}*'in kromozomal veya plazmit kaynaklı olduğunu ortaya koymuştur (46, 50). Bir çalışmada, klinik bir *A. faecalis* suşunda non-konjugatif bir plazmit üzerinde bulunan, farklı bir çalışmada ise *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Providencia stuartii* suşlarında kromozom üzerinde saptanan *bla_{PER-1}*'in, birbirine çok benzer yapıdaki "IS" elemanlarıyla bitişik olduğu belirlenmiştir (52, 76). Ancak PER-1 üreten suşlarda, *bla_{PER-1}* ile integronların ilişkisi gösterilememiştir (47, 52). Hastanemizde izole edilen suşlarda *bla_{PER-1}* geninin sınıf-1 integronların üzerinde olup olmadığını araştırmak amacıyla, farklı ERIC-PZT paternlerine sahip *bla_{PER-1}(+)* *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, benzer çalışmalar kaynak alınarak, sınıf-1 integronların korunmuş bölgelerine (5'-CS, 3'-CS) ve *bla_{PER-1}*'e özgü (PER-1A, PER-1B) primerler kombine edilerek PZT uygulanmıştır (4, 52, 90). Üç *P. aeruginosa* suşunda, 5'-CS ve PER-1B primerleriyle yapılan PZT sonucu yaklaşık 2300 bp'lik bir ürün elde edilmesi ve bu ürünü kalıp olarak kullanarak *bla_{PER-1}*'e özgü primerlerle gerçekleştirilen PZT'nin bir *P. aeruginosa* suşunda (ERIC-PZT paterni: "Z", integron paterni: "Ω") *bla_{PER-1}*'e özgü yaklaşık 900 bp'lik bant oluşturması, söz konusu suşta PER-1 geninin sınıf-1 integronla ilişkili olduğunu göstermiştir. Daha sonra, söz konusu PZT ürününün DNA dizi analizi, *bla_{PER-1}*'e ait olduğunu doğrulamıştır. Bu sonuçlar, literatürde ilk defa, *bla_{PER-1}*'in bir sınıf-1 integronun üzerinde olduğunu ortaya koymaktadır. PER-1 geninin, integron gibi hareketli genetik elemanların içeriğinde yer alması, farklı türler veya aynı türün üyeleri arasında yayılımını hızlandırıcı bir rol oynayacaktır. Ayrıca, *bla_{PER-1}*'le ilişkili bulunan integronun yapısının aydınlatılması, moleküler direnç mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesini sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

PER-1 enziminin, geniş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olması, çeşitli hareketli genetik elemanlar üzerinde yer alabilmesi, klinik olarak önemini arttıran faktörlerdir (22, 50). Ayrıca PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşlarıyla gelişen infeksiyonların, hastalardaki kötü klinik tabloyla doğrudan ilişkili olduğu da gösterilmiştir (74). Başta Türkiye olmak üzere, Avrupa'da birçok merkezde ve Kore'de, *bla_{PER-1}* saptanan suşlar bildirilmiştir (46, 47, 54, 73). Hastanemizde izole edilen seftazidime dirençli Gram-negatif bakteriler arasında PER-1 enziminin moleküler epidemiyolojik özelliklerini araştırdığımız çalışmamızda, genel olarak, seftazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının diğer β -laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu ve incelenen ajanlar içinde en etkilisinin imipenem olduğu belirlenmiştir. İmipenemin tek başına veya bir aminoglikozitle birlikte kullanımının PER-1 üreten suşlara karşı etkinliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş, ancak yoğun karbapenem kullanımının, bu antibiyotiğe dirençli suşların hızla ortaya çıkışına neden olduğu da saptanmıştır (46, 60). PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, beta-laktamların yanı sıra; aminoglikozit ve florokinolonlar gibi önemli antibiyotik gruplarına da direnç gelişebilmesi tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. PER-1 üreten suşların neden olduğu salgınlarda, infeksiyon kontrol önlemlerine özenle uyulması, antibiyotik kullanım politikalarının dikkatle oluşturulması ve suşların direnç fenotipindeki değişikliklerin izlenmesi gereklidir.

Çift disk sinerji testiyle GSBL paterni görülmesi ve İEO gibi fenotipik yöntemler tek başlarına PER-1 saptanmasında yeterli ve güvenilir değildir (54, 58). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar da, PER-1 üreten *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp* suşlarının saptanmasında çift disk sinerji yönteminin güvenilir olmadığı yönündeki bulguları desteklemektedir. TEM-1 gibi sık rastlanan bir enzimin izoelektrik noktasının (pI: 5.4) PER-1'inkine (pI: 5.3) çok yakın oluşu, İEO ile PER-1 ayrımını güçleştirmektedir. PZT, prob-hibridizasyon ve DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler PER-1

belirlenmesinde daha güvenilirdir (58). *bla_{PER-1}* genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZT sonucu hastanemizde izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının % 46.2'sinin ve *A. baumannii* suşlarının % 35.9'unun bu geni taşıdığı saptanmıştır. Bu oranlar, Türkiye'de çok merkezli çalışmalarda elde edilen oranlarla benzer olup, hastanemizde de PER-1 üreten suşların yaygın olduğunu göstermektedir (47, 75). Çalışmamızda, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları dışında, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli bir *Alcaligenes faecalis* izolatında da *bla_{PER-1}* geni saptanması, bu geni taşıyan bakterilerin çeşitliliğinin artabileceğine işaret etmektedir. Farklı türlerde bulunan *bla_{PER-1}*'in çevresindeki genetik yapıların aydınlatılmasının, bu genin kaynağı ve yayılım şekli hakkında bilgi verebileceği düşünülmektedir.

ERIC-PZT sonuçları, *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında saptanan endemik iki büyük klonun (*P. aeruginosa*'da X ve Y, *A. baumannii*'de A ve B) hastanemizdeki yüksek PER-1 prevalansından sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. *P. aeruginosa* izolatlarında toplam dört, *A. baumannii*'lerde ise üç farklı klon gözlenmiştir. Birçok suşun “klonal ilişkili” oluşu, PER-1 üreten izolatların horizontal olarak yayılım gösterdiğine işaret etmektedir. Bu durum, *bla_{PER-1}* taşıyan suşların yayılımını kontrol etmek için, infeksiyon kontrol önlemlerine özenle uyulması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Antibiogram plaklarında GSBL paterni ve/veya IPM-CAZ diskleri arasında sinerji görülen bir grup *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunda, PZT yöntemiyle PER-1, TEM veya SHV grubu enzim saptanamamıştır. Bu suşlardan bazılarının İEO tekniği ile incelenmesi sonucu TEM-1 (pI: 5.4) ve SHV-2 (pI: 7.6) kontrolleri arasında bant gözlenmesi, klavulanik asitle inhibe olabilen GES (pI_{GES-1}: 5.8), IBC (pI_{IBC-1}: 6.9) veya VEB (pI_{VEB-1}: 7.4) gibi “A” grubu GSBL'lerin varlığını düşündürmektedir. Söz konusu enzimlere özgü primerlerle yapılacak PZT ve DNA dizi analizi çalışmalarıyla, hangi enzim veya enzimlerin GSBL paterninden sorumlu olduğunu anlamak mümkün olacaktır.

bla_{PER-1}'in çeşitli türlerde plazmit veya kromozom üzerinde olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (21, 46, 50, 52). Hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}* (+) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında gerçekleştirilen; konjugasyon, plazmit izolasyon ve plazmitten kurtarma deneyleri, incelenen suşlarda PER-1 geninin kromozom üzerinde bulunduğu işaret etmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal direnç genlerinin yayılımında önemli rol oynayan sınıf-1 integronların, hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}* (+) suşlardaki, varlığı ve epidemiyolojik değeri PZT ile araştırılmış, suşların farklı sayı ve büyüklüklerde integronlar içerdikleri anlaşılmıştır. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında farklı ERIC-PZT paternleri sergileyen suşların genelde farklı integron içeriklerine sahip oldukları gözlenmiştir.

bla_{PER-1} geninin sınıf-1 integronların üzerinde olup olmadığını araştırmak amacıyla, hastanemizde izole edilen *bla_{PER-1}*(+) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, benzer çalışmalar kaynak alınarak, sınıf-1 integronların korunmuş bölgelerine ve *bla_{PER-1}*'e özgü primerler kombine edilerek PZT uygulanmıştır (4, 52, 90). Üç *P. aeruginosa* suşunda, 5'-CS ve PER-1B primerleriyle yapılan PZT sonucu yaklaşık 2300 bp'lik bir ürün elde edilmesi ve bu ürünü kalıp olarak kullanarak *bla_{PER-1}*'e özgü primerlerle gerçekleştirilen PZT'nin bir *P. aeruginosa* suşunda, *bla_{PER-1}*'e özgü yaklaşık 900 bp'lik bant oluşturması, söz konusu suşta PER-1 geninin sınıf-1 integronla ilişkili olduğunu göstermiştir. PZT ürününün DNA dizi analizi sonucu da, *bla_{PER-1}*'e ait olduğunu doğrulamıştır. Bu sonuçlar, literatürde ilk defa, *bla_{PER-1}*'in bir sınıf-1 integronun üzerinde olduğunu ortaya koymaktadır. PER-1 geninin, "doğal ekspresyon vektörleri" olarak da adlandırılan integron gibi hareketli genetik elemanların içeriğinde yer alması, yayılımını hızlandıracak ve farklı direnç genleriyle bir arada bulunma olasılığını arttıracaktır. PER-1 gibi direnç genlerinin içinde buldukları genetik elemanların yapıların aydınlatılmasının, moleküler direnç mekanizmalarının anlaşılmasına ve akılcı kontrol önlemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Öncül O. Hastane kökenli Gram-negatif çomaklarda direnç. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p94, 19-23 Eylül, 2004, Kuşadası, Aydın, Türkiye.
2. Arman D, Uçan E.S. Hastane kökenli pnömonide antibiyotik tedavisi, In: Arman D, Uçan ES, editors. Hastane kökenli pnömoni ve tedavisi.1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.p. 61-71.
3. Karadenizli A, Vahaboğlu H. Antibiyotik direnci ve klinik yansıması. In: Arman D, Uçan ES, editors. Hastane kökenli pnömoni ve tedavisi.1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p.73-92.
4. Poirel L, Menuteau O, Agoli N et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 2003; 41: 3542-3547.
5. Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in the community. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 52-59.
6. Ağca H, Doğan G, Atay T, Gülay Z. Kan kültüründen sık izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p399, 19-23 Eylül, 2004, Kuşadası, Aydın, Türkiye.
7. Doğan G, Ağca H, Atay T, Gülay Z. İdrar yolu enfeksiyonu etkenleri ve antibiyotik duyarlılıklarının retrospektif olarak incelenmesi. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p403, 19-23 Eylül, 2004, Kuşadası, Aydın, Türkiye.

8. Eraç B, Gülay Z. Prevalance and molecular epidemiology of PER-1 beta-lactamase in Gram-negative bacteria.13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract Book: p , May 10–13, 2003, Glasgow / UK.
9. Gülay Z. Gram-negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg 2005; 19 (Ek 2): 66-77.
10. Aktaş F. Gram-negatif bakterilerin hastane infeksiyonlarındaki rolü ve epidemiyolojisi, In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p. 183-206.
11. Zarakolu P. Gram-negatif bakterilerin temel mikrobiyolojik özellikleri ve sınıflandırması, In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p. 9-43.
12. Salyers AA, Whitt DD, editors. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2nd edition. Washington DC: ASM Pres, 2002; 407-421.
13. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. Jawetz, Melnick, Adlberg's Medical Microbiology. Twenty-second edition. USA: Appleton&Lange, 2001; 7-38.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997; 785-856.
15. Özgüven V. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. İnfeksiyon hastalıkları ve patolojisi. 1th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. p.192-202.

16. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p.1076-1102.
17. Gür D. Gram-negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları, In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri enfeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p. 69-83.
18. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8: 557-584.
19. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
20. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14: 933-951.
21. Nordmann P, Ronco E, Naas T ve ark. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 962-969.
22. Vahaboğlu H, Sarıbaş S, Akbal H, Öztürk R, Yücel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J. Antimicrob. Chemother 1998; 42: 269-270.
23. Bauernfeind A, Stemplinger R, Jungwirth P ve ark. Characterization of β -lactamase gene *bla_{PER-2}*, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 616-620.

24. <http://www.lahey.org/studies>
25. Açıkgöz ZC, Gülay Z, Biçmen M ve ark. CTX-M-3 Extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. Scand J Infect Dis 2003; 35: 503-505.
26. Lartigue MF, Poirel L, Heritier C ve ark. First description of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 315-316.
27. Gülay Z, Terek G, Eraç B ve ark. High prevalance of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of *Enterobacteriaceae* in Turkey. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract Book: p752, May 1-4, 2004, Prague, Czech Republic.
28. Ayhan FY, Ağin H, Eraç B ve ark. The evaluation of clusters of hospital infections due to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in the neonatal clinic of a children's hospital: A two years period of experience. Sixth Congress of the International Federation of Infection Control Abstract Book: , October 13-16, 2005, Istanbul, Turkey.
- 29 Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 321–331.
30. Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar, In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p. 95-110.
31. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 15–23.
32. Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 326–328.

33. Tenover FC, Schaberg DR. Molecular biology of resistance. In: Bennett JV, Brachman PS, editors. Hospital infections. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p.237-247.
34. Weinstein RA, Hayden MK. Multiply drug-resistant pathogens: epidemiology and control. In: Bennett JV, Brachman PS, editors. Hospital infections. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p.215-236.
35. Weldhagen G.F. Integrons and β -lactamases- a novel perspective on resistance. Int J Antimicrob Agents 2004; 23: 556-562.
36. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:185-191.
37. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 155-162.
38. Naas T, Mikami Y, Imai T ve ark. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of Escherichia coli which carries an unusual array of gene cassettes. J Bacteriol 2001; 183:235-249.
39. Dubois V, Poirel L, Marie C ve ark. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla_{GES-1} and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6')-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:638-645.
40. Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol 1997; 5: 389-394.
41. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and site-specific recombination system it determines. J Bacteriol 2002; 184: 3017-3026.

42. Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, Gjernes E, Kapperud G. Prevalence and characterization of integrons in blood culture *Enterobacteriaceae* and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2004; 3: 12.
43. Fonseca EL, Viera VV, Cipriano R, Vicente ACP. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005; 44: 303-309.
44. Maguire AJ, Brown DFJ, Gray JJ, Desselberger U. Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1022-1029.
45. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 104-114.
46. Luzzaro F, Mantengoli E, Perili M ve ark. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase. *J Clin. Microbiol* 2001; 39: 1865-1870.
47. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, ve ark. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-2269.
48. Vahaboğlu H, Hall LM, Mulazımoğlu L ve ark. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. *Journal of Medical Microbiology* 1995; 43: 294-299.
49. Pereira M, Perilli M, Mantengoli E ve ark. PER-1 extended-spectrum beta-lactamase production in an *Alcaligenes faecalis* clinical isolate resistant to expanded-spectrum

cephalosporins and monobactams from a hospital in Northern Italy. *Microb Drug Resist.* 2000; 6:85-90.

50. Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 281-294.

51. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R ve ark. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2523-2529.

52. Poirel L, Cabanne L, Vahaboğlu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla_{PER-1}* gene in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1708-1713.

53. Petroni A, Corso A, Melano R ve ark. Plasmidic Extended-Spectrum β -Lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1462–1468.

54. Yong D, Shin JH, Kim S ve ark. High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003; 47: 1749-1751.

55. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G ve ark. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 910-911.

56. Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L ve ark. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol* 2002; 40: 1549-1552.

57. Bahar G, Erac B, Mert A, Gulay Z. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. *J Chemother* 2004; 16: 343-6.

58. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392.
59. Aktaş Z, Poirel L, Şalcıoğlu M ve ark. PER-1 and OXA-10-like β -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in İstanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 193-198.
60. Mimos O, Elhelali N, Leotard S ve ark. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 91-97.
61. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (eski-NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement, NCCLS document M100-S14. Wayne, Pennsylvania, USA 2004; 30-104.
62. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988 ; 10: 867-78.
63. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volume 3. 3th Edition. New York, Cold Spring Harbor Press, 2001; A8.9.
64. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res* 1991; 19: 6823-6831.
65. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 332-370.

66. Matthew M, Harris AM, Marshall JM, Ross GW. The use of analytic isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-78.
67. Amyes SG, Gould IM. Trimethoprim resistance plasmids. *Ann Microbiol (Paris)*. 1984; 135B: 177-86.
68. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 1983; 100: 243-255.
69. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
70. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. Gram-negatif non-fermentatif çomaklarda karbapenemlere etkili beta-laktamazlar. *ANKEM Derg* 1998; 12: 509-513.
71. Severino P, Magalhaes VD. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 156-162.
72. Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 398-402.
73. Claeys G, Verschraegen G, Baere T, Vaneechoutte M. PER-1 β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(6): 924-925.
74. Vahaboğlu H, Coşkun 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: 642-645.

75. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, ve ark. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* FEMS Microbiol Lett 2005; 249: 241-245.
76. Mantengoli E, Rossolini GM. Tn5393d, a complex Tn5393 derivative carrying the PER-1 extended-spectrum β -lactamase gene and other resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3289-3296.
77. Poirel L, Karim A, Mercat A ve ark. Extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 157–158.
78. De Champs C, Chanal C, Sirot D ve ark. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 634-639.
79. Vignoli R, Varela G, Mota MI ve ark. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. J Clin Microbiol 2005; 43: 2940–2943.
80. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M ve ark. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 {beta}-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 975-978.
81. Danes C, Navia M M, Ruiz J ve ark. Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 261-264.
82. Naiemi N A, Duim B, Savelkoul P H M ve ark. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. J Clin Microbiol 2005; 43: 4862-4864.

83. Bou G, Beltran JM. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 428-432.
84. Ploy M C, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2684-2688.
85. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 176: 411-419.
86. Ruiz J, Navia MM, Casals C ve ark. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 907-11.
87. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J ve ark. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3074-82
88. Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 1233-40.
89. Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A ve ark. An integron-associated β -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum β -lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 627-630.
90. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 463-469.